

Aus der Klinik für Innere Medizin I mit den Schwerpunkten Gastroenterologie,  
Hepatologie, Pneumologie, internistische Intensivmedizin, Endokrinologie,  
Infektiologie, Rheumatologie, Ernährungs- und Altersmedizin  
(Direktor: Prof. Dr. Stefan Schreiber)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Molekulare Untersuchung anti-entzündlicher Effekte von  
Omega-3-Fettsäuren auf wnt5a in Patienten mit gastrointestinalem oder  
urologischem Karzinom: eine randomisierte, kontrollierte Studie.

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
Julia Maria Valentin  
aus Walsrode

Kiel 2018

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Laudes, Klinik für Innere Medizin I mit den Schwerpunkten Gastroenterologie, Hepatologie, Ernährungs- und Altersmedizin

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Derk Frank, Klinik für Innere Medizin III mit den Schwerpunkten Kardiologie und Angiologie

Tag der mündlichen Prüfung: 23.09.2019

Zum Druck genehmigt:

Kiel, den 28.06.2019

Prof. Dr. Johann Roider  
(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungen.....</b>	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Hintergrund.....	1
1.2 Metabolische Entzündung .....	1
1.3 Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) .....	3
1.4 Tumorummunologie .....	4
1.5 Wnt5a .....	5
1.6 Omega-3-Fettsäuren .....	6
1.7 GPR120 und TLR4 als Bindeglieder zwischen $\omega$ -3-FS und wnt5a .....	9
1.8 Ziel dieser Arbeit .....	9
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>11</b>
2.1 Materialien.....	11
2.1.1 Verbrauchsmaterial.....	11
2.1.2 Chemikalien .....	12
2.1.3 Puffer & Lösungen .....	13
2.1.4 Zelllinien .....	15
2.1.5 Antikörper .....	15
2.1.6 Kits .....	15
2.1.7 Geräte.....	16
2.1.8 Computer Software .....	17
2.1.9 Fragebögen .....	17
2.1.10 Nährstoffinformationen .....	17
2.2 Methoden .....	19
2.2.1 Studiendesign .....	19
2.2.2 Ein- und Ausschlusskriterien.....	20
2.2.3 Blutentnahme .....	20
2.2.4 PBMC-Isolation.....	20
2.2.5 RNA- und Protein-Aufreinigung .....	22
2.2.6 Bestimmung der Protein- und RNA-Konzentration .....	23
2.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	23
2.2.8 Western Blotting .....	25

2.2.9 Immundetektion der Proteine.....	26
2.2.10 Stripping .....	27
2.2.11 Densitometrie und Normalisierung .....	28
2.2.12 Bioelektrische Impedanzanalyse (BIA) .....	28
2.2.13 Ernährungsfragebogen .....	28
2.2.14 Short Form (SF)-12 Gesundheitsfragebogen.....	30
2.2.15 FoCus-Kohorte .....	31
2.2.16 ELISA .....	31
2.2.17 Statistische Analysen .....	34
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>35</b>
3.1 Studienpopulation.....	35
3.2 Auswertung der Western Blots .....	36
3.3 Showblot .....	38
3.4 Auswertung der Bioelektrischen Impedanzanalysen.....	38
3.5 Auswertung der SF-12 Fragebögen.....	39
3.6 Auswertungen der FoCus-Daten .....	42
3.6.1 Studienpopulation .....	42
3.6.2 Assoziation zwischen den wnt5a Konzentrationen und der $\omega$ -3-FS Zufuhr .....	43
3.6.3 Vergleich der wnt5a Serumkonzentration bei hoher (> 250 mg/d) und niedriger ( $\leq$ 250 mg/d) täglicher $\omega$ -3-FS Zufuhr .....	44
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>45</b>
4.1 Allgemeines .....	45
4.2 Präoperative orale Nahrungssupplementierung mit Trinknahrungen und präoperative Immunonutrition.....	46
4.3 Kontroverse Ergebnisse zu $\omega$ -3-FS .....	47
4.4 Ergebnisse: Beeinflussung der wnt5a-Expression durch präoperative Immunonutrition .....	49
4.5 Lebensqualität und Krebsdiagnose .....	50
4.6 Ergebnisse: Beeinflussung der Lebensqualität durch die Einnahme der Trinknahrungen .....	52
4.7 Wnt5a und andere Karzinome .....	52
4.8 Limitationen der Studie.....	54
4.9 Abschließende Zusammenfassung und Ausblick .....	55
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>56</b>
<b>6. Abstract .....</b>	<b>57</b>

<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>58</b>
<b>8. Anhang.....</b>	<b>66</b>
<b>9. Erklärung .....</b>	<b>77</b>
<b>10. Danksagung .....</b>	<b>78</b>
<b>11. Veröffentlichung .....</b>	<b>79</b>

**Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1:</b> Therapeutische Ziele an der Schnittstelle von metabolischen und inflammatorischen Signalwegen. ....	2
<b>Abbildung 2:</b> Schema der Hämatopoese. ....	3
<b>Abbildung 3:</b> Strukturformel von Docosahexaensäure (DHA) ....	7
<b>Abbildung 4:</b> Darstellung verschiedener Wirkmechanismen von $\omega$ -3-FS. ....	8
<b>Abbildung 5:</b> Mechanismus des anti-inflammatorischen GPR120 aktiviert durch $\omega$ -3-FS in Makrophagen. ....	10
<b>Abbildung 6:</b> Verteilung der Probanden auf die Studienarme. ....	19
<b>Abbildung 7:</b> Studienablauf.....	20
<b>Abbildung 8:</b> Darstellung der Vierschichtung bei der PBMC-Isolation.. ....	21
<b>Abbildung 9:</b> Aufbau der Blotting Kammer.....	26
<b>Abbildung 10:</b> Relevante Fragen aus dem Verzehrhäufigkeitsfragebogen. ....	29
<b>Abbildung 11:</b> Punkte vom SF-12 .....	30
<b>Abbildung 12:</b> Prinzip eines ELISAs. ....	32
<b>Abbildung 13:</b> Herstellung der verdünnten Standardlösungen.....	33
<b>Abbildung 14:</b> Boxplots der Expression von wnt5a [%] zum Zeitpunkt $t_0$ und $t_2$ . ...	37
<b>Abbildung 15:</b> Boxplots der Expression von NF- $\kappa$ B [%] zum Zeitpunkt $t_0$ und $t_2$ . ....	37
<b>Abbildung 16:</b> Showblot. ....	38
<b>Abbildung 17:</b> Boxplots der Ergebnisse der Körperlichen Summenskala zum Zeitpunkt $t_0$ und $t_2$ . ....	40
<b>Abbildung 18:</b> Boxplots der Ergebnisse der Psychischen Summenskala zum Zeitpunkt $t_0$ und $t_2$ .. ....	41
<b>Abbildung 19:</b> Korrelation zwischen der Zufuhr von $\omega$ -3-FS und wnt5a Serumkonzentrationen.....	43
<b>Abbildung 20:</b> Vergleich der wnt5a Serumkonzentrationen bei niedriger und hoher täglicher Zufuhr von $\omega$ -3-FS. ....	44
<b>Abbildung 21:</b> wnt5a Signalwege in humanen Tumoren oder Tumormodellen.....	53

**Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b> Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	11
<b>Tabelle 2:</b> Übersicht der verwendeten Chemikalien.....	12
<b>Tabelle 3:</b> Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen und deren Zusammensetzung .....	13
<b>Tabelle 4:</b> Übersicht der verwendeten Zelllinien .....	15
<b>Tabelle 5:</b> Übersicht der verwendeten Antikörper .....	15
<b>Tabelle 6:</b> Übersicht der verwendeten Kits .....	15
<b>Tabelle 7:</b> Übersicht der verwendeten Geräte .....	16
<b>Tabelle 8:</b> Übersicht der verwendeten Computer Software .....	17
<b>Tabelle 9:</b> Übersicht der verwendeten Fragebögen .....	17
<b>Tabelle 10:</b> Nährstofftabelle für Fresubin® Protein Energy.....	18
<b>Tabelle 11:</b> Nährstofftabelle für Supportan®DRINK.....	18
<b>Tabelle 12:</b> Rezept für das Gießen eines SDS-Gels.....	24
<b>Tabelle 13:</b> Patientencharakteristika.....	35
<b>Tabelle 14:</b> Ergebnisse der Densitometrie von wnt5a und NF- $\kappa$ B zum Zeitpunkt $t_0$ und $t_2$ . ....	37
<b>Tabelle 15:</b> Ergebnisse der BIA zum Zeitpunkt $t_0$ und $t_2$ .....	39
<b>Tabelle 16:</b> Ergebnisse der SF-12 Fragebögen zum Zeitpunkt $t_0$ und $t_2$ .....	40
<b>Tabelle 17:</b> Daten der FoCus Teilpopulation.....	42

**Abkürzungen**

<b>Abkürzung</b>	
ALA	$\alpha$ -Linolensäure
ALDH1	Aldehyd-Dehydrogenase 1
ALI	<i>acute lung injury</i>
APC	Adenomatöses Polyposis Coli
APS	Ammoniumpersulfat
AXIN	<i>Axis inhibition protein</i>
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BIA	Bioelektrische Impedanzanalyse
BMI	Body-Mass-Index
BZM	Muskel- und Organzellmatrix
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
COPD	Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung
DGEM	Deutsche Gesellschaft für Ernährungsmedizin
DHA	Docosahexaensäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPA	Eicosapentaensäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZM	Interstitium, Knochen und Bindegewebe
EZW	Extrazelluläres Wasser
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
HCl	Salzsäure
IKK	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase</i>
IL	Interleukin
IZW	Intrazelluläres Wasser
JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
KCl	Kaliumchlorid
KHK	Koronare Herzkrankheit



KSK	Körperliche Summenskala
LPS	Lipopolysaccharide
MMP	Matrixmetalloproteinase
NaCl	Natriumchlorid
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
$\omega$ -3-FS	Omega-3-Fettsäuren
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PKC	Protein Kinase C
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PSK	Psychische Summenskala
ROR	<i>Receptor kinase like orphan receptor</i>
Ryk Receptor	<i>Related to receptor tyrosine kinase receptor</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SF-12/-36	<i>Short Form-12/-36</i>
TAA	Tumorassoziierte Antigene
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBS/T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung und Tween® 20
TCF	Transkriptionsfaktor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
TIC	<i>Tumor initiating cells</i>
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
TSA	Tumorspezifische Antigene
T2DM	Typ 2 Diabetes Mellitus
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

## 1. Einleitung

### 1.1 Hintergrund

Entzündungsvorgänge spielen nicht nur in der Pathophysiologie von Stoffwechselerkrankungen eine wichtige Rolle, sondern auch bei malignen Prozessen (1). Daraus folgt die Bestrebung, anti-entzündliche Strategien als therapeutisches Ziel bei Tumorerkrankungen zu entwickeln. Omega-3-Fettsäuren ( $\omega$ -3-FS) haben eine anti-entzündliche Wirkung (2). Das pro-inflammatorische Glykoprotein wnt5a wird von Makrophagen sezerniert und wirkt auto- und parakrin. Dieses Zytokin greift sowohl in Stoffwechselvorgänge als auch in die Onkogenese ein. Durch *in vitro* Versuche konnte eine Regulation der wnt5a Expression in antigenpräsentierenden Zellen über den *Toll-like receptor 4* (TLR4)/ *Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B) Signalweg gezeigt werden (3). NF- $\kappa$ B kann wiederum durch die Aktivierung des G-Protein gekoppelten Rezeptors 120 (GPR120) durch  $\omega$ -3-FS inhibiert werden (4).

Kann die Expression des pro-inflammatorischen wnt5a's *in vivo* durch die orale Zufuhr von  $\omega$ -3-FS inhibiert werden?

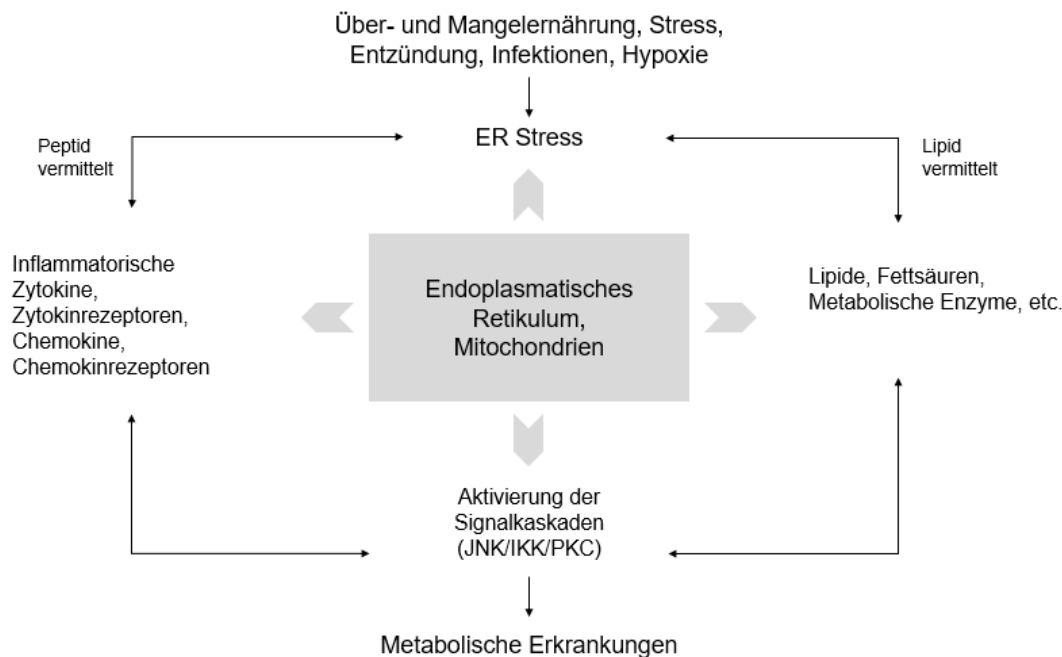
### 1.2 Metabolische Entzündung

Die metabolische Entzündung, auch *Metaflammation* genannt, ist eine Folge von Über- und Fehlernährung. Begleit- und Folgeerkrankungen können Typ 2 Diabetes Mellitus (T2DM) und Herz-Kreislauf-Erkrankungen sein. Die *Metaflammation* ist durch die Einwanderung von Entzündungszellen in das betroffene Gewebe gekennzeichnet (5).

Bei einem Nahrungsüberangebot oder einem -mangel entsteht oxidativer Stress. Pro-inflammatorische Zytokine, Chemokine, Lipide, Fettsäuren und metabolische Enzyme aktivieren bei oxidativem Stress pro-inflammatorische Signalwege. Es entwickelt sich ein *Circulus vitiosus* aus dem metabolische Erkrankungen entstehen können (s. Abb. 1) (6). Zu diesen Erkrankungen gehören neben dem Metabolischen Syndrom und möglichen kardiovaskulären Folgeerkrankungen wie Atherosklerose,

Herzinfarkte und Schlaganfälle auch Krebserkrankungen, Fettleber, Asthma, Schlaf Apnoe, Osteoarthritis und Gallenblasenerkrankungen (6). Das Metabolische Syndrom ist gekennzeichnet durch abdominelle Fettleibigkeit, Hypertonie, einer gestörten Glucosetoleranz und Fettstoffwechselstörungen mit einer Hypertriglyzeridämie und einem erniedrigten HDL-Cholesterin. Das Metabolische Syndrom ist eine Folge des modernen Lebensstils mit einem Nahrungsüberangebot und wenig Bewegung. Es ist mit einer erhöhten Sterblichkeit verbunden und wird deswegen auch als *Tödliches Quartett* bezeichnet. In Deutschland leiden 30-35% der Einwohner an einem Metabolischen Syndrom. Die Tendenz ist steigend (7). Neben der Vorbeugung ist es wichtig, metabolische Erkrankungen effektiv zu therapieren.

Ein möglicher Ansatz, metabolische Erkrankungen zu therapieren, besteht darin, in die Signalwege der metabolischen Entzündung einzugreifen. Durch die Gabe von Antikörpern sollen Zytokine und Rezeptoren wie die C-Jun-N-terminale Kinase (JNK), die Protein Kinase C (PKC) oder die *Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase* (IKK) inhibiert und deren Signalwege beendet werden (s. Abb. 1) (6).



**Abbildung 1: Therapeutische Ziele an der Schnittstelle von metabolischen und inflammatorischen Signalwegen.** Über- und Mangelernährung führen zu Stress im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Lipid- oder peptidvermittelt werden verschiedene Signalwege (JNK/IKK/PKC) aktiviert, sodass es zur Entstehung verschiedener metabolischer Krankheiten kommen kann. Ein möglicher Therapieansatz, metabolische Erkrankungen zu behandeln, ist die Inhibition einzelner Signalwege (modifizierte Abbildung, 6).

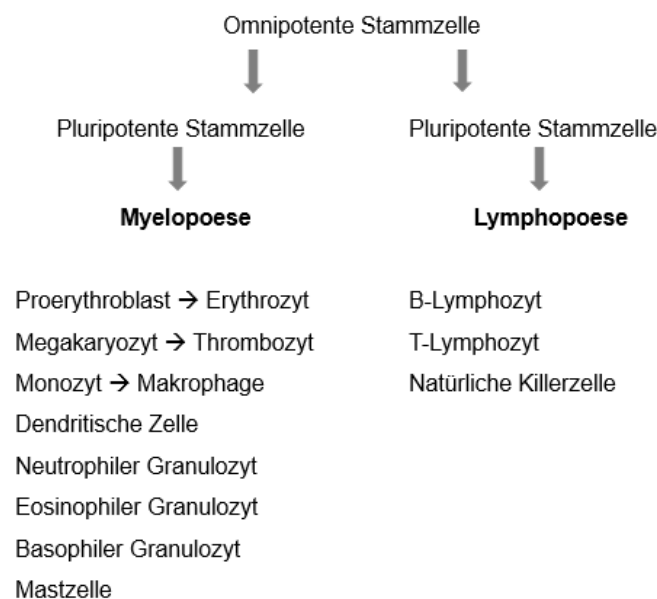
### 1.3 Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

PBMCs sind mononukleäre Zellen des peripheren Blutes. Zu ihnen gehören Monozyten und Lymphozyten, Zellen des Immunsystems (8).

Monozyten entstehen wie Granulozyten aus den myeloischen Vorläuferzellen während der Myelopoese im Knochenmark (s. Abb. 2) (9-11). Sie dienen der unspezifischen Abwehr, entwickeln sich weiter zu Makrophagen und dendritischen Zellen (10) und präsentieren so Antigene, dienen als Phagozyten und zerstören Tumorzellen (12).

Lymphozyten entstehen während der Lymphopoese aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark (10,13). Die weitere Differenzierung findet unter anderem in Lymphknoten und der Milz statt. Sie dienen der spezifischen Immunabwehr gegen Krankheitserreger und körpereigenen entarteten Zellen (13).

Bei Entzündungen oder Infektionen kommt es zu einem Anstieg der PBMCs (9).



**Abbildung 2: Schema der Hämatopoese.**

*Über die Myelopoese entstehen Erythrozyten, Thrombozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten und Mastzellen. Über die Lymphopoese entstehen B- und T-Lymphozyten sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen) (modifizierte Darstellung, 10).*

## 1.4 Tumorimmunologie

Die Anfänge der Tumorimmunologie liegen schon über 100 Jahre zurück. Als Begründer der Tumorimmunologie gilt der New Yorker Chirurg *William Coley*, der 1891 einen Sarkom-Patienten mit absichtlich ausgelöstem Fieber durch eine Streptokokken-Injektion direkt in den Tumor erfolgreich behandelte. Er dokumentierte die Behandlungsverläufe von fast 1.000 Patienten, die er mit dieser Methode behandelte und stellte dabei eine Heilungsrate von 10% fest. Durch die Streptokokken-Infektion werde das Immunsystem aktiviert und angeregt. Dadurch bekämpfe das Immunsystem nicht nur die Infektion sondern auch den Tumor. Es resultiere eine Tumorregression (14).

Erst Ende des 20. Jahrhunderts kam es zur Entdeckung von tumorspezifischen (TSA) und tumorassoziierten Antigenen (TAA). Das ließ das Interesse an der Tumorimmunologie wieder steigen (14). Das Immunsystem kann Tumoren anhand von TSA oder TAA erkennen. Die Antigene werden von Tumorzellen gebildet und ins Blut abgegeben oder sie verbleiben an der Tumorzelloberfläche. In der Tumordiagnostik werden TSA und TAA wie z.B. Ca19-9 beim Pankreas-Karzinom als Verlaufskontrolle genutzt. Über die zelluläre und humorale Immunantwort agiert das Immunsystem gegen den Tumor. Da die Immunantwort gegenüber Tumoren häufig unzureichend ist, gibt es therapeutische Ansätze, um die Immunantwort zu unterstützen (15). Dabei spielen Antikörper wie bei den Therapieansätzen gegen die metabolische Entzündung eine wichtige Rolle. Biologicals, bei denen es sich um rekombinant hergestellte Proteine, meist Antikörper, handelt, greifen gezielt in immunologische Prozesse ein. Sie werden bei Autoimmunerkrankungen und Malignomen eingesetzt. Trastuzumab, ein HER-2-neu-Antikörper, kann bei einem Mamma- und einem Magenkarzinom mit HER-2-neu-Überexpression zusätzlich zur Chemotherapie gegeben werden. Durch die Gabe wird das Therapieansprechen gesteigert und die progressionsfreie Überlebenszeit verlängert (16).

## 1.5 Wnt5a

1982 haben *Harold Varmus* und *Roel Nusse* das *Int1*-Gen, später *wnt-1*, in Mäusen entdeckt, das die Entwicklung von Mammakarzinomen in Mäusen fördert, wenn es aktiviert wird (17). Es ist das erste Gen der *wnt*-Familie. Zwei Jahre zuvor entdeckte *Christiane Nüsslein-Volhard* das *wingless* Gen in der Fliege *Drosophila melanogaster*. Die *Drosophila* entwickelt keine Flügel, wenn das *wingless* Gen fehlt (18). Wie sich herausstellte sind das *Int1*-Gen und das *wingless* Gen identisch. So entwickelte sich der Name der *wnt*-Gen Familie (19). Bis jetzt wurden 19 sezernierte lipid-modifizierte Glykoproteine identifiziert, die zur *wnt*-Familie gehören. Eines von ihnen ist *wnt5a*, ein pro-inflammatorisches Effektormolekül, das von Makrophagen sezerniert wird (20,21). *Wnt5a* wirkt auto- und parakrin und wird außer von Makrophagen von verschiedenen Zelltypen wie Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Monozyten sezerniert (22).

*Wnt5a* vermittelt seine Effekte über kanonische und nicht-kanonische Signalwege und ist in vielen Zellprozessen wie der Zellmotilität, der Zelldifferenzierung, der Apoptose, der Stammzellenhomöostase und der Lymphozytendifferenzierung beteiligt (3).

Je nach Rezeptorverfügbarkeit kann *wnt5a* den kanonischen Signalweg aktivieren oder hemmen. Insgesamt interagiert *wnt5a* hauptsächlich mit den nicht-kanonischen Signalwegen (22,23).

Das *wnt5a* Gen codiert für zwei verschiedene Transkripte, sodass zwei unterschiedliche *wnt5a* Proteine produziert werden. Eine lange Isoform mit 337 Aminosäuren (*wnt5a-L*) und eine kurze Isoform mit 319 Aminosäuren (*wnt5a-S*). *Wnt5a-L* inhibiert die Proliferation von Tumorzelllinien, *wnt5a-S* dagegen fördert ihr Wachstum (24).

Mutationen in *wnt*-Genen oder in den *wnt*-Signalwegen führen zu spezifischen Defekten. Diese Mutationen können zu verschiedenen Krankheiten, unter anderem zu Tumoren, führen (25).

*Wnt5a* kann je nach Tumorentität und aktiviertem Signalweg entweder onkogene Effekte haben oder als Tumorsuppressor wirken.

Es wird vermutet, dass *wnt5a* beim Prostatakarzinom die Zellproliferation (26) fördert und als chemischer Botenstoff, der Knochenmetastasen induziert, wirksam ist (27).

Beim Magenkarzinom werden nicht-kanonische Signalwege durch wnt5a aktiviert. Über diese Aktivierung führt wnt5a zur Tumorprogression (28). Außerdem kann wnt5a im Magen zu einer Rekrutierung von Makrophagen und damit zu einer Magenschleimhautentzündung führen (29).

Es wurde nachgewiesen, dass wnt5a im Gewebe humaner Pankreaskarzinome überexprimiert ist und dass wnt5a dort die Tumormigration fördert. In einem Mausmodell ist die Invasivität, die Proliferations- und Metastasierungsrate durch eine Überexpression von wnt5a erhöht (30,31).

Mehrere Studien zeigen, dass wnt5a in der Tumorzellinvasion, der -metastasierung, dem -metabolismus und der -inflammation eine Rolle spielt. Wnt5a-Signalwege interagieren zwischen den Tumorzellen und deren Mikroumgebung und führen zu einer Tumorprogression (32). So ist wnt5a ein interessantes und mögliches Therapieziel für gastrointestinale und urologische Karzinome.

## 1.6 Omega-3-Fettsäuren

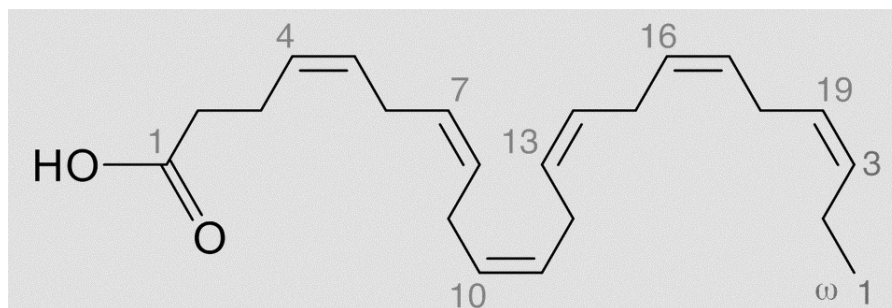
Heutzutage sind  $\omega$ -3-FS weit verbreitet. Sie werden in vielen Nahrungsmitteln supplementiert und man geht davon aus, dass  $\omega$ -3-FS einen positiven Einfluss auf die Gesundheit haben.

Die essentiellen Fettsäuren wurden 1929 von dem amerikanischen Ehepaar *Burr* entdeckt. Sie fanden heraus, dass man  $\alpha$ -Linolensäure (ALA) über die Nahrung aufnehmen muss und dass diese Fettsäure für die Gesundheit von Bedeutung ist. Sie führten ein Defizit-Experiment mit Ratten durch und kamen zu dem Ergebnis, dass es bei den Tieren durch eine mehrmonatige fettfreie Diät zu einem Defizit-Syndrom kam, das zum Tod führen konnte. In einem weiteren Experiment zeigten sie, dass die Ratten durch geringe Mengen an ALA, zugeführt in Formen von Oliven- oder Leinöl, geheilt werden konnten (33–35).

Einige Jahre später (1971) veröffentlichten die Dänen *Bang und Dyerberg* den Artikel *Plasma lipid and lipoprotein pattern in greenlandic west-coast eskimos* in *The Lancet*. Da die Inuits aus Grönland eine sehr geringe Inzidenz an Herzinfarkten und T2DM haben, verglichen *Bang und Dyerberg* Blutfette und Plasmalipid Muster der grönländischen Inuits mit denen dänischer Inuits. Die meisten Lipidkonzentrationen

waren bei den grönländischen Inuits höher als bei den dänischen Kontrollen, außer die vom prä- $\beta$ -Lipoprotein und die der Plasma-Triglyceride. Anhand dieser Resultate erklärten sich die Wissenschaftler die niedrige Inzidenz von Herzinfarkten und die Abstinenz von T2DM bei grönländischen Inuits. Die grönländische Population, die untersucht wurde, ernährte sich hauptsächlich von tierischem Fleisch, von Walen, Robben, Meeresvögeln und Fischen (Lodde, Lachs und Heilbutt). Diese Ernährung war sehr protein- und fettreich. Trotz dieser fettreichen Nahrung haben die Inuits sehr niedrige Triglycerid- und Cholesterin-Level. *Bang und Dyerberg* erklärten das damit, dass diese tierischen Fette einen hohen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren haben, die vor einem steigenden Triglycerid- und Cholesterinspiegel schützen (36).

$\omega$ -3-FS gehören zu den ungesättigten Fettsäuren. Sie besitzen die letzte Doppelbindung vom Carboxylende aus gesehen an der dritten C-C-Bindung. Zu den bekannten  $\omega$ -3-FS gehören ALA (18:3), Eicosapentaensäure (EPA, 20:5) und Docosahexaensäure (DHA, 22:6) (s. Abb. 3).



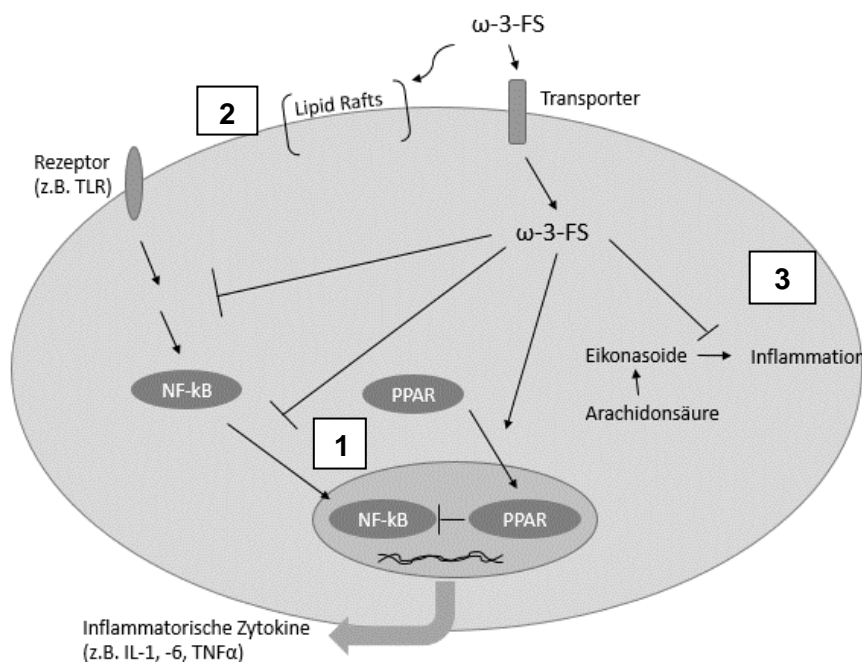
**Abbildung 3: Strukturformel von Docosahexaensäure (DHA) (37).**

Das Vorkommen von  $\omega$ -3-FS in Lebensmitteln ist vor allem auf pflanzliche Öle wie Chia-, Lein-, Walnuss- und Rapsöl oder auf Fischöl beschränkt. Besonders  $\omega$ -3-FS-reiche Fische sind Lachs, Sardellen und Sardinen.



Zu den gesundheitsfördernden Wirkungen von  $\omega$ -3-FS gehören die Senkung des Fibrinogenspiegels, der Triglyceride und des Blutdruckes. Die Fluidität von Zellmembranen und die Wirksamkeit der Leukozyten werden gesteigert. Das Risiko, an Alzheimer zu erkranken oder an plötzlichem Herztod zu versterben wird gesenkt (38).  $\omega$ -3-FS wirken anti-entzündlich, -thrombotisch, -arrhythmisch, hypolipidämisch und vasodilatatorisch. Diese Eigenschaften sind zur Sekundärprävention für Patienten mit Koronarer Herzkrankheit (KHK), T2DM, arterieller Hypertension, Rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa und Chronisch Obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) von Nutzen (2).

$\omega$ -3-FS aktivieren verschiedene Signalwege. Über eine Modulation der Zellkernrezeptor-Aktivierung folgt eine Suppression von NF- $\kappa$ B (s. Abb. 4.1). Die von der Arachidonsäure abgeleiteten Eikosanoide werden durch  $\omega$ -3-FS supprimiert und dadurch werden die Prostaglandin E<sub>2</sub>-abhängigen Signalwege gehemmt (s. Abb. 4.3). Außerdem wird die Plasmamembran Mikroorganisation (*Lipid Raft*) durch  $\omega$ -3-FS verändert (s. Abb. 4.2) (39).



**Abbildung 4: Darstellung verschiedener Wirkmechanismen von  $\omega$ -3-FS.**

1. Suppression der Zellkern-Rezeptor-Aktivierung über die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR), wodurch die Genexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 und -6 (IL-1, IL-6) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) beeinflusst wird und NF- $\kappa$ B gehemmt wird. 2. Umorganisation von Lipid Rafts, 3. Inhibition der Signalwege, die durch Eikosanoiden zu einer Entzündung führen können (modifizierte Abbildung, 39).

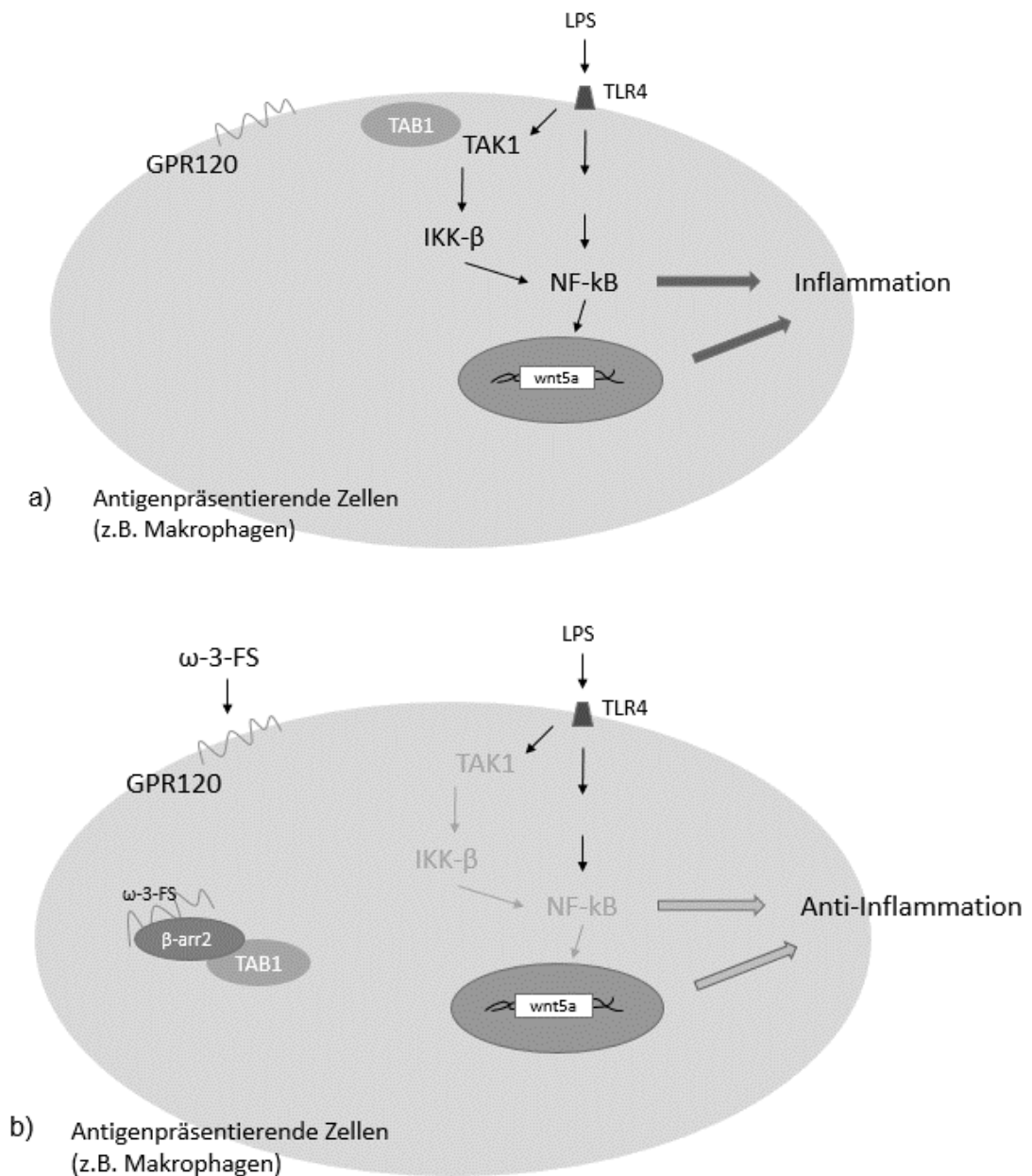
## 1.7 GPR120 und TLR4 als Bindeglieder zwischen $\omega$ -3-FS und wnt5a

GPR120, ein mittel- und langkettiger Fettsäurerezeptor, ist ein physiologischer Rezeptor in Makrophagen und Adipozyten, über den  $\omega$ -3-FS eine anti-inflammatorische Wirkung vermitteln können. ALA, DHA und EPA sind Aktivatoren des GPR120 (40).

Über GPR120 können die  $\omega$ -3-FS die pro-inflammatorischen Signalwege der Lipopolysaccharide (LPS) ausschalten. LPS sind Aktivatoren vom TLR4. TLR4 ist ein transmembranöses Protein und gehört zu der Familie der TLR, einem Teil der *pattern recognition receptor* (PRR) Familie. IKK- $\beta$  wird durch den TLR4 aktiviert und dadurch wird das pro-inflammatorische Molekül NF- $\kappa$ B aktiviert (3,4). Über NF- $\kappa$ B wird die Transkription von wnt5a in Makrophagen vermittelt (s. Abb. 5a). Diese zuvor unbekannte Induktion von wnt5a in Makrophagen beschreiben *Blumenthal et al.* 2006 in *Blood* (3). Binden  $\omega$ -3-FS an GPR120 können die pro-inflammatorischen Signalwege unterbrochen werden, indem GPR120 mit  $\beta$ -arrestin2 und TAB1 einen Komplex bildet. TAB1 kann so nicht mehr an TAK1 binden und IKK- $\beta$  und NF- $\kappa$ B werden inhibiert (s. Abb. 5b) (4). Demzufolge müsste somit auch die Transkription von wnt5a inhibiert werden.

## 1.8 Ziel dieser Arbeit

Mit dieser humanen Interventionsstudie soll die anti-entzündliche Wirkung von  $\omega$ -3-FS bei Patienten mit urologischem oder gastrointestinalem Karzinom *in vivo* untersucht werden. Es wird geprüft, ob  $\omega$ -3-FS einen Einfluss auf die pro-inflammatorischen Moleküle wnt5a und NF- $\kappa$ B in mononukleären Zellen des peripheren Blutes wie Monozyten (Makrophagen, dendritischen Zellen) und Lymphozyten haben.



**Abbildung 5: Mechanismus des anti-inflammatorischen GPR120 aktiviert durch  $\omega$ -3-FS in Makrophagen.** Modifizierte Abbildung (3,4). A) LPS aktiviert über den TLR4 u.a. IKK- $\beta$ . IKK- $\beta$  wiederum aktiviert NF- $\kappa$ B, das die Transkription von wnt5a fördert. Wnt5a und NF- $\kappa$ B wirken pro-inflammatorisch (3,4). B) Durch die Aktivierung des GPR120 durch  $\omega$ -3-FS wird der pro-inflammatorische Signalweg von TLR4 über IKK- $\beta$  und NF- $\kappa$ B unterbrochen (4).

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterial

**Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien**

<b>Name</b>	<b>Produktnummer</b>	<b>Firma</b>
Biosphere® Filter Tips 0,1-2,5 µl	70.1130.217	Sarstedt
Biosphere® Filter Tips 0,1-20 µl	70.1114.215	Sarstedt
Biosphere® Filter Tips 2-200 µl	70.760.216	Sarstedt
Biosphere® Filter Tips 100-1000 µl	70.762.211	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen 15 ml	62.554.020	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen 50 ml	62.559.001	Sarstedt
Roti® -PVDF Membran, Porengröße 0,45 µm	T830.1	Roth
Reagiergefäße 1,5 ml	72.690.001	Sarstedt
Reagiergefäße 2 ml	72.695.500	Sarstedt
Reagiergefäße 1,5 ml DNA low bind	72.706.700	Sarstedt
Serologische Pipetten 5 ml	86.1253.001	Sarstedt
Serologische Pipetten 10 ml	86.1254.001	Sarstedt
Serologische Pipetten 25 ml	86.1685.001	Sarstedt
Whatman™ Filter Papier	1003-917	GE Healthcare

## 2.1.2 Chemikalien

**Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Chemikalien**

<b>Name</b>	<b>Produktnummer</b>	<b>Firma</b>
6-Aminocapronsäure	A2504	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS) 10%	9592.3	Roth
40 % Acrylamid-, Bisacrylamid- Stammlösung in einem Verhältnis von 5:1	T802.1	Roth
Ethanol	8.18760.2500	Merck
Ficoll-Plaque™ PLUS	17-1440-02	GE Healthcare
Glycin	3908.2	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	1.049.360.500	Merck
4 x Laemmli Sample Puffer	161-0737	Bio Rad
Methanol	4627.2	Roth
2-Mercaptoethanol	BCBF9538V	Sigma
Milkpowder blotting grade	T145.2	Roth
Natriumchlorid (NaCl, 0,9%)	10209126	Berlin-Chemie AG
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	L0615-500	biowest
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	P8340	Sigma-Aldrich
2-Propanol	1.09634.2500	Merck
Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer	46430	Thermo Scientific
Salzsäure (HCl) 25%	1.00316.1000	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	04051.1	Biomol

SuperSignal® West Dura Extendend Duration Substrate	34075	Thermo Scientific
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	2367.3	Roth
Tris Base	4855.2	Roth
Tween® 20	P2287	Sigma
Wasser Rotisolv HPLC	A511.1	Roth
WesternSure™ Pen	926-91000	LI-COR
Western Sure Prestained Chemieluminescent Protein Ladder	926-98000	LI-COR

### 2.1.3 Puffer & Lösungen

**Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen und deren Zusammensetzung**

<b>Puffer &amp; Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Acrylamid 30 %	75 ml 40 % ige Acrylamid-, Bisacrylamid-Lösung 25 ml dH <sub>2</sub> O
Blockierungspuffer (5%ige Milchpulverlösung)	5 g Milchpulver 95 ml TBS/T
Ethanol (70%)	30 ml HPLC-Wasser 70 ml Ethanol p.a.
Ladepuffer	90 µL 4x Laemmli Sample Puffer 10 µL 2-Mercaptoethanol
10 x SDS Laufpuffer	60,4 g Tris Base 288 g Glycin 20 g SDS mit dH <sub>2</sub> O auf 2000 ml auffüllen
1 x SDS Laufpuffer	100 ml 10 x SDS mit dH <sub>2</sub> O auf 1000 ml auffüllen

10 x Trisgepufferte Salzlösung (TBS)	140 g NaCl 4 g KCl 60 g Tris Base pH 7,4 mit HCl einstellen mit dH <sub>2</sub> O auf 2000 ml auffüllen
1 x Trisgepufferte Salzlösung mit Tween® 20 (TBS/T)	100 ml 10 x TBS 1 ml Tween® 20 mit dH <sub>2</sub> O auf 1000 ml auffüllen
Transfer Puffer 1	36,34 g Tris Base 200 ml Methanol mit dH <sub>2</sub> O auf 1000 ml auffüllen
Transfer Puffer 2	3,03 g Tris Base 200 ml Methanol mit dH <sub>2</sub> O auf 1000 ml auffüllen
Transfer Puffer 3	3,03 g Tris Base 200 ml Methanol 5 g Aminocaprinsäure mit dH <sub>2</sub> O auf 1000 ml auffüllen
Tris HCl (1.88 M)	22,71 g Tris HCL 70 ml dH <sub>2</sub> O 25% HCl hinzugeben, bis der pH bei 8,8 ist. Mit dH <sub>2</sub> O auf 1000 ml auffüllen
Tris HCl (0.625 M)	7,57 g Tris HCL 70 ml dH <sub>2</sub> O 25% HCl hinzugeben, bis der pH bei 6,8 ist. mit dH <sub>2</sub> O auf 1000 ml auffüllen
Trenngel (1 Gel)	2 ml dH <sub>2</sub> O 0,7 ml SDS (1%) 1,4 ml Tris HCl (1,88 M) 2,9 ml Acrylamid (30%) 35 µl APS 6 µl TEMED
Sammelgel (1 Gel)	1,1 ml dH <sub>2</sub> O

0,2 ml SDS (1%)  
 0,4 ml Tris HCl (0,625 M)  
 0,3 µl Acrylamid (30%)  
 10 µl APS  
 2 µl TEMED

#### 2.1.4 Zelllinien

**Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Zelllinien**

##### **Zelllinie**

THP-1 Zellen, ACC 16, DZSM	Periphere AML-Zellen eines ein-jährigen Jungen
----------------------------	--

#### 2.1.5 Antikörper

**Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Produktnummer</b>	<b>Firma</b>
Wnt5a/b C27E8 Rabbit mAb	2530S	Cell Signaling
NF-κB Rabbit mAb	GR206979-4	abcam
GAPDH (14C10) Rabbit	2118S	Cell Signaling
Anti-Rabbit IgG HRP-linked Antibody	7074S	Cell Signaling

#### 2.1.6 Kits

**Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Kits**

<b>Kit</b>	<b>Produktnummer</b>	<b>Firma</b>
All Prep® RNA/Protein Kit	80404	QIAGEN
ELISA Kit: wnt5a	SEP549Mi	Cloud-Clone Corp.



## 2.1.7 Geräte

**Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
Vakuumpumpe	Mini-Membran Vakuumpumpe, VP 86, VWR
Mithras LB	Berthold Technologies
Sterilbank	HeraSafe, ThermoElectron Corporation
Blotting Kammer	Fastblot Semi-Dry 014-200, biometra
ChemiDoc™ XRS+	721BR07558, Bio-Rad
Stromquelle	Standard Power Pack P25, Biometra
Glaspipetten	567/2, Hecht-Assistent
Halteapparatur für die Gele	165-8001, Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad
Kamm	165-8001, Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad
Magnetrührer	519520, IKAMAG RCT, Polzin Laborbedarf
Mikropipetten	Research, Plus Eppendorf
NanoDrop One	AZY1602753, ThermoScientific
Nutriguard-MS	Data-Input
Pipettierhelfer	Pipetboy Akku, Integra Biosciences
Schüttler	535112, PMR-30, Grant-bio
Thermoschüttler	846-051-600, ThermoShaker TSC, Biometra
Tischzentrifuge	T464.1, Rotilabo®-mini-centrifuge, Roth
Schüttelgerät	SI-0256, Vortex-Genie 2, Scientific Industries
Schüttelgerät	MS 1 Minishaker, IKA
Waage bis 200 g	AES, Kern
Waage bis 6 kg	GAB, Kern
Wasserbad	14 Liter / 1003, Gesellschaft für Labortechnik
Zentrifuge	Hareaus® Multifuge®, Thermo Electron Corporation
Zentrifugen Rotor	75002000, TTH-400 Swinging Bucket Rotor, Thermo Fisher Scientific

### 2.1.8 Computer Software

**Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Computer Software**

Computer Software	Version	Firma
Image Lab™	4.0	Bio-Rad Laboratories GmbH, Germany
EBISpro		Universität Hohenheim-Stuttgart, Dr. J. Erhardt
Nutrigard-MS		Data-Input
NutriPlus©		Data-Input
Excel 2013	2013	Microsoft Corporation, USA
SPSS	24	IMB Deutschland GmbH, Germany

### 2.1.9 Fragebögen

**Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Fragebögen**

#### Fragebogen

Short Form (SF)-12	Hogrefe Verlag, Göttingen, 0119511
Auswertungsbogen SF-12	Hogrefe Verlag, Göttingen, 0119516
Ernährungsfragebogen	Abteilung Epidemiologie des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke, ©2013-2015, ffq2 Revision: 4162 – CEDBT/UKSH

### 2.1.10 Nährstoffinformationen

#### Fresubin® Protein Energy DRINK

Fresubin® Protein Energy ist eine hochkalorische (1,5 kcal/ml) und proteinreiche (10 g/100 ml) Trinknahrung ohne Ballaststoffe. Sie wird bei erhöhtem Eiweiß- und Energiebedarf wie beispielsweise bei konsumierenden Erkrankungen eingesetzt.

Der Nährstoffgehalt ist der Tabelle 10 zu entnehmen. Zusätzlich sind Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamine enthalten (41).

**Tabelle 10: Nährstofftabelle für Fresubin® Protein Energy****100 ml enthalten:**

Energie	150 kcal
Eiweiß	10 g
Kohlenhydrate	12,4 g
Fett	6,7 g
davon gesättigte FS	0,6 g
davon einfach ungesättigte FS	4,9 g
davon mehrfach ungesättigte FS	1,2 g
Ballaststoffe (0,71 Energie %)	0,51 g

**Supportan® DRINK**

Supportan® ist eine hochkalorische (1,5 kcal/ml), eiweiß- (10 g/100 ml) und  $\omega$ -3-FS-reiche Trinknahrung mit Ballaststoffen. Die  $\omega$ -3-FS EPA und DHA entstammen Fischöl. Die Trinknahrung wird bei konsumierenden Erkrankungen und Kachexie eingesetzt.

Der Nährstoffgehalt ist der Tabelle 11 zu entnehmen. Zusätzlich sind Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamine enthalten (42).

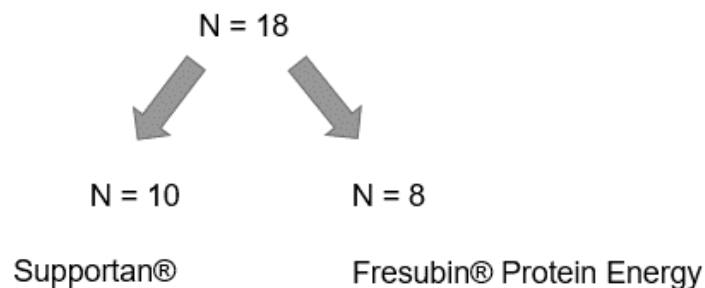
**Tabelle 11: Nährstofftabelle für Supportan®DRINK****100 ml enthalten:**

Energie	150 kcal
Eiweiß	10 g
Kohlenhydrate	11,6 g
Fett	6,7g
davon gesättigte Fettsäuren	2,8 g
davon einfach ungesättigte Fettsäuren	1,6 g
davon mehrfach ungesättigte Fettsäuren	2,3 g
davon EPA	0,5 g
davon DHA	0,21 g
Ballaststoffe (2 Energie %)	1,5 g

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Studiendesign

Die Studie ist eine monozentrische, prospektive, randomisierte, kontrollierte, humane klinische Studie und wurde von der Ethikkommission Kiel genehmigt. In die Studie wurden 18 Probanden mit urologischem oder gastrointestinalem Tumor eingeschlossen. Alle Probanden wurden ausführlich aufgeklärt und haben schriftlich in die Studienteilnahme eingewilligt. Die Probanden erhielten randomisiert die mit  $\omega$ -3-FS angereicherte Trinknahrung Supportan® oder die Standardtrinknahrung Fresubin® Protein Energy (s. Abb. 6).



**Abbildung 6: Verteilung der Probanden auf die Studienarme.**

*Verteilung der Probanden mit gastrointestinalem oder urologischem Karzinom auf die Studienarme mit  $\omega$ -3-FS (Supportan®) und ohne  $\omega$ -3-FS (Fresubin® Protein Energy).*

Die Studie lief über zwei Wochen, in denen die Probanden die Trinknahrungen jeweils 2 x täglich, zusätzlich zu einer individuellen ausgewogenen Ernährung, einnahmen. Bei jedem Teilnehmer wurden 30 ml peripheres Blut für die PBMC- und die darauffolgende Protein-Isolation abgenommen. Um die Körperzusammensetzung zu bestimmen, wurde eine Bioelektrische Impedanzanalyse (BIA) durchgeführt. Die zusätzliche  $\omega$ -3-FS Aufnahme wurde anhand eines Ernährungsfragebogens ermittelt und die gesundheitsbezogene Lebensqualität anhand des Short Form (SF)-12 erfasst. Nach zwei Wochen wurden erneut 30 ml peripheres Blut abgenommen und auch die BIA und der SF-12 wurden erneut durchgeführt (s. Abb. 7).


**t<sub>0</sub>** = Tag 1

- Aufklärung und Einwilligung
- Periphere Blutentnahme:  
3 x 9 ml EDTA
- BIA
- Ernährungsfragebogen
- SF-12

**t<sub>2</sub>** = Tag 14

- Periphere Blutentnahme:  
3 x 9 ml EDTA
- BIA
- SF-12

2 x täglich 200 ml der Trinknahrung Supportan® oder Fresubin® Protein Energy


**Abbildung 7: Studienablauf**

## 2.2.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Für die Probanden galten folgende Ein- und Ausschlusskriterien:

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Urologisches oder gastrointestinales Karzinom	Darmatonie
Einwilligungsfähigkeit vorhanden	Ileus
Mangelernährung (Gewichtsverlust von mind. 4 kg in den letzten 6 Monaten)	Transaminasen > 3-fache der Norm
	Kreatinin > 1,5 mg/dl
	Akute Pankreatitis

## 2.2.3 Blutentnahme

Bei jedem Probanden wurden 3 x 9 ml EDTA Blut peripher abgenommen. Aus diesem Blut wurden die PBMCs isoliert.

## 2.2.4 PBMC-Isolation

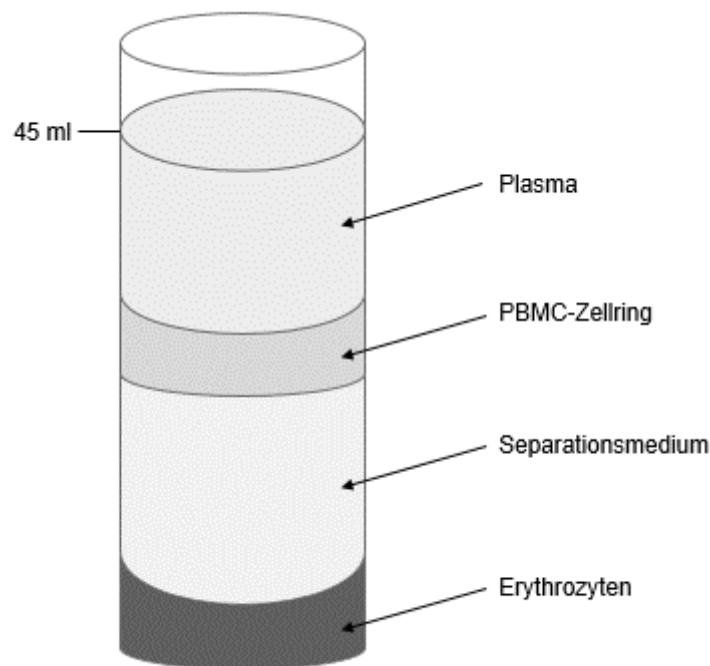
Die PBMC-Isolation fand unter der Sterilbank statt.

In zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden jeweils 15 ml des Separationsmediums Ficoll-Plaque™ PLUS pipettiert. Das entnommene EDTA-Blut (30 ml) wurde

gleichmäßig auf zwei neue 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt und in gleichem Verhältnis mit 0,9%igem NaCl verdünnt und invertiert.

Das Gemisch aus Blut und NaCl schichtete man anschließend vorsichtig auf das Separationsmedium.

Beide Zentrifugenröhrchen wurden bei 400xg und 20°C für 35 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren konnte man eine Vierschichtung sehen: Plasma, PBMC-Zellring, Separationsmedium, Erythrozyten (s. Abb. 8).



**Abbildung 8: Darstellung der Vierschichtung bei der PBMC-Isolation.** *Von unten nach oben sind folgende Komponenten im Zentrifugenröhrchen geschichtet: Erythrozyten, Separationsmedium, PBMC-Zellring und Plasma (modifizierte Abbildung, 43).*

Im Anschluss wurde das Plasma abgesaugt und verworfen. Als nächstes konnte der PBMC-Zellring mit einer Pipette abgenommen werden, in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit 0,9%igem NaCl auf 50 ml aufgefüllt und gemischt werden. Nun wurde das Gemisch bei 300xg und 20°C für 10 Minuten mit Bremse zentrifugiert. Man verwarf den Überstand und resuspendierte das Zellpellet in 10 ml 0,9%igem NaCl. Mit einer isotonischen Kochsalzlösung wurde das Röhrchen wieder auf 50 ml aufgefüllt und erneut bei 200xg und 20°C für 12 Minuten mit Bremse

zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen werden und das Zellpellet in 0,9%igem NaCl resuspendiert werden. Der letzte Zentrifugationsvorgang wurde wiederholt.

Es erfolgte eine Lyse des Zellpellets in 200 µL APL und eine fünf minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Das Lysat konnte direkt für die RNA/Protein-Isolation weiter verwendet werden oder bei - 80°C zur Aufbewahrung gelagert werden.

### 2.2.5 RNA- und Protein-Aufreinigung

Für die RNA- und die Protein-Aufreinigung wurde das *All Prep® RNA/Protein Kit* verwendet und nach Protokoll - wie folgt - gearbeitet:

Zur Vorbereitung der Protein-Aufreinigung schüttelte man die grüne Säule vorsichtig, öffnete die obere Kappe durch eine Vierteldrehung, knickte den Bodenverschluss ab und platzierte die Säule in ein 2 ml Reagiergefäß. Die grüne Säule wurde dann für drei Minuten bei 0,75xg zentrifugiert, 500 µl PBS wurden als Equilibrierungspuffer hinzugegeben und vorsichtig geschüttelt. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 0,75xg für drei Minuten. Der Durchfluss wurde verworfen und die grüne Säule in einem 1,5 ml Reagiergefäß für die Protein-Aufreinigung platziert und aufbewahrt.

Das Lysat (Pellet und 200 µl APL-Puffer) aus der PBMC-Isolation pipettierte man auf die lila Säule und zentrifugierte es bei 8xg für eine Minute. Die RNA war in der Membran gebunden und wurde für die RNA-Aufreinigung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die Proteine, die im Durchfluss waren, wurden langsam auf die Protein-Aufreinigungssäule pipettiert und bei 0,24xg für drei Minuten zentrifugiert. Zu den 200 µl Protein im Durchfluss gab man 2 µl Protease Inhibitor Cocktail (PIC). Die Protein-Aufreinigung war damit abgeschlossen und die Probe konnte bei - 80°C zur Aufbewahrung gelagert werden.

Für die RNA-Aufreinigung wurde wieder die lila Säule benötigt, in deren Membran die RNA gebunden war. Auf die Säule gab man 350 µl RLT-Puffer und zentrifugierte bei 8xg für eine Minute. Zu dem Durchfluss wurden 350 µl Ethanol (70%) gegeben und gut gemischt. Die gesamten 700 µl wurden auf die rosa Säule gegeben und bei 8xg für eine Minute zentrifugiert. Dadurch war die RNA an die Membran der Säule

gebunden. Die nächsten drei Schritte dienen dem Waschen der Membran. Zunächst pipettierte man 700 µl RW1 Puffer auf die Säule und zentrifugierte bei 8xg für eine Minute. In den folgenden zwei Schritten gab man jeweils 500 µl RPE auf die rosa Säule und zentrifugierte bei 8xg für eine Minute. Durch zwei erneute Zentrifugationsvorgänge bei maximaler Geschwindigkeit für jeweils eine Minute wurden die Waschpuffer entfernt. Im letzten Schritt pipettierte man 30 µl RNase-freies Wasser auf die Membran der Säule und zentrifugierte bei 8xg für eine Minute. Die gereinigte RNA im Durchfluss konnte zur Aufbewahrung bei - 80°C gelagert werden.

### **2.2.6 Bestimmung der Protein- und RNA-Konzentration**

Der NanoDrop One, ein UV-Vis-Spektralphotometer, wurde zur Bestimmung der RNA- bzw. Proteinkonzentrationen der Proben verwendet.

Über die bekannten Proteinkonzentrationen konnte man die Proteinmenge, die man für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese brauchte, ermitteln.

### **2.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Bei der Gelelektrophorese wird ein Proteingemisch nach seinem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Negativ geladene Moleküle wandern von der Kathode zur Anode. Dabei werden größere Moleküle stärker zurückgehalten. Kleinere Moleküle dagegen gelangen besser durch die Poren des Gels. Die SDS-PAGE ist ein diskontinuierliches Verfahren. Bei dem SDS-Gel, bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel, kommt es zu einer radikalischen Polymerisation von Acrylamid mit Bisacrylamid. Dabei wirkt Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter und Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator. Das Sammelgel dient dem Sammeln der Proben an der Grenze zum Trenngel. Es hat größere Poren als das Trenngel und der pH Wert ist niedriger. Im Trenngel wird das Proteingemisch dann entsprechend des Molekulargewichtes aufgetrennt. Die Porengröße des Gels kann je nach Konzentration des verwendeten Acrylamids und Bisacrylamids variiert werden (44,45).



Zur Herstellung eines SDS-Gels wurde zunächst der Halteapparat aufgebaut und zwei aneinander gelegte Glasplatten in den Halteapparat eingefügt.

Im ersten Schritt stellte man das Trenngel her (s. Tbl. 12). Das Trenngel wurde mit einer 1000 µl Pipette zwischen die zwei Glasplatten pipettiert, mit ca. 500 µl Isopropanol beschichtet und für 30 Minuten auspolymerisiert.

Nach dem Auspolymerisieren entfernte man das Isopropanol und stellte das Sammelgel her (s. Tbl. 12). Das Sammelgel wurde auf das Trenngel pipettiert und der Kamm als Platzhalter für die Probenaschen zwischen die Glasscheiben gesteckt. Das Sammelgel polymerisierte für 10 bis 15 Minuten aus.

**Tabelle 12: Rezept für das Gießen eines SDS-Gels**

<b>Trenngel (1 Gel)</b>	<b>Sammelgel (1 Gel)</b>
2 ml dH <sub>2</sub> O	1,1 ml dH <sub>2</sub> O
0,7 ml SDS (1%)	0,2 ml SDS (1%)
1,4 ml Tris HCl (1,88 M)	0,4 ml Tris HCl (0,625 M)
2,9 ml Acrylamid (30%)	0,3 µl Acrylamid (30%)
35 µl APS	10 µl APS
6 µl TEMED	2 µl TEMED

Die Proteinproben tauten vor der Verwendung auf Eis auf. Anschließend verwendete man von jeder Probe jeweils eine Proteinmenge von 50 µg und überführte sie in neue 1,5 ml Reagiergefäße.

Zu den Proteinproben gab man in einem Verhältnis von 1:1 einen Ladepuffer, bestehend aus 90 µl 4 x Laemmli-Puffer und 10 µl beta-Mercaptoethanol. Beta-Mercaptoethanol diente als Reduktionsmittel und spaltete Disulfidbrücken. Anschließend denaturierten die Proben für fünf Minuten bei 95°C auf einem Thermoschüttler, sodass die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufbrachen und die Proteine in ihrer Primärstruktur vorlagen.

Die SDS-PAGE-Kammer wurde aufgebaut, mit 1 x SDS Laufpuffer befüllt, der Kamm zwischen den Glasplatten entfernt und die Taschen des SDS-Gels mit den Proteinproben (max. 25-30 µl) befüllt.

Als Positiv-Kontrolle wurden 50 µg THP-1-Zelllysate verwendet. Die THP-1-Zellen wurden mit PMA (1000 ng/ml) für 24 Stunden differenziert. Nach weiteren 24 Stunden wurden sie für 24 Stunden mit LPS (1000 ng/ml) inkubiert und in einem letzten Schritt in 3 ml RIPA Puffer lysiert.

5 µl APL-Puffer wurden als Negativ-Kontrolle verwendet.

Zum Sammeln der Proteine wurde die Stromquelle für 10 Minuten auf 80 V gestellt, für die Proteintrennung anschließend für 1-1,5 Stunden auf 120 V. Wenn die Proben bis kurz vor die Gelkante gelaufen waren, wurde der Strom abgestellt und der Vorgang war beendet.

### 2.2.8 Western Blotting

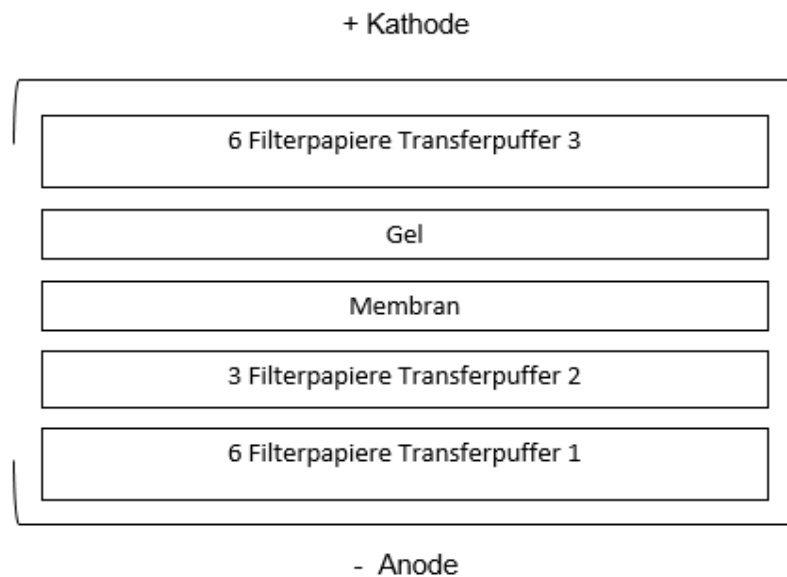
Der Western Blot ist ein Verfahren nach *J. Renart et al.*, bei dem Proteine auf eine Trägermembran übertragen werden, um anschließend detektiert werden zu können. *J. Renart et al.* führte das Verfahren mit Diazobenzylloxymethyl-Papier ein. Durch *H. Towbin et al.* wurde es auf Nitrocellulose umgestellt. Heute benutzt man zum Beispiel Polyvinylidenfluorid-Membranen. Der Name Western Blot ist eine Anlehnung an den Southern Blot nach *Edwin Southern*, der dem Übertragen von DNA-Fragmenten dient. Der Northern Blot dient der Übertragung von RNA-Fragmenten.

Für die Übertragung der Proteine von dem SDS-Gel auf die Trägermembran wird ein zum Gel senkrechtes elektrisches Feld angelegt. Die Proteine wandern von der Kathode zur Anode und bleiben an der Membran aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen hängen (46).

Für den Blot mussten zunächst Filterpapiere (7x8 cm) in den Transferpuffern getränkt werden und eine Polyvinylidenfluorid-Membran zur Aktivierung für ca. 30 Sekunden in Methanol geschwenkt werden. Anschließend wurde die Membran für mindestens drei Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen.

Die Filterpapiere stapelte man auf dem Blotter in folgender Anordnung: an der Anode die sechs Filterpapiere des Transferpuffers 1, darüber die drei des Transferpuffers 2, über diese Filterpapiere die aktivierte Membran und darauf das Gel, das vorher vorsichtig von den beiden Glasplatten gelöst werden musste. Zuletzt folgten an der

Kathode des Blotters die sechs Filterpapiere des Transferpuffers 3 (s. Abb. 9). Eventuelle Luftblasen konnten durch Rollen auf dem Filterpapierstapel mit einer serologischen Pipette (5 ml) entfernt werden. Zur Übertragung der Proteine auf die Membran wurde bei einem Gel eine Einstellung von 70 mA für 45 Minuten gewählt.



**Abbildung 9: Aufbau der Blotting Kammer** (*eigene Darstellung*).

### 2.2.9 Immundetektion der Proteine

Nach dem Übertragen der Proteine auf die Membran wurden sie durch die Immundetektion sichtbar gemacht. Dazu nutzt man einen primären und einen sekundären Antikörper. Der primäre Antikörper ist antigenspezifisch und bindet an das Antigen, das detektiert werden soll. Der sekundäre Antikörper ist ein Makierungsantikörper und bindet wiederum an den primären Antikörper (46).

Für die Immundetektion wurde die Membran mit 20 ml 5%iger Milchpulverlösung für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Dieses *Blocken*

verhindert, dass die freien Stellen auf der Membran im späteren Verlauf mit Antikörpern besetzt werden.

Der primäre Antikörper, *Wnt5a/b C27E8 Rabbit monoklonaler Antikörper*, wurde in einer Verdünnung von 1:250 in 10 ml 5%iger Milchpulverlösung angesetzt, auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wusch man die Membran dreimal fünf Minuten mit 1 x TBS/T.

Der sekundäre Antikörper, *Anti-Rabbit IgG HRP-linked Antibody*, wurde in einer Verdünnung von 1:2000 in 10 ml 5%iger Milchpulverlösung angesetzt und auf die Membran gegeben. Die Membran wurde bei Raumtemperatur für 45 Minuten mit dem Antikörper inkubiert und dreimal für 10 Minuten mit 1 x TBS/T gewaschen. In einem letzten Arbeitsschritt wurde die Membran für fünf Minuten mit dem Chemilumineszenz-Substrat *SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate* inkubiert. Dadurch setzte die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase das Chemilumineszenz-Substrat in ein lumineszierendes Signal um und dieses konnte im Abbildungssystem *ChemiDoc™ XRS+* detektiert werden.

### 2.2.10 Stripping

Die Antikörper wurden von den Proteinen entfernt, damit weitere Proteine mit gleicher oder ähnlicher Größe detektiert werden konnten. Dieser Vorgang wird *Stripping* genannt.

Die Membran wurde für 10 Minuten mit 1 x TBS/T bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gewaschen und für 15 Minuten mit 20 ml *Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer* inkubiert. Nach dem *Stripping* wurde sie erneut dreimal für jeweils fünf Minuten gewaschen. Über Nacht blockte man die Membran mit ca. 20 ml 5%iger Milchpulverlösung bei 4°C. Am nächsten Tag setzte man den primären Antikörper an.

Nach einem ersten *Stripping* verwendete man den *NF-κB Rabbit monoklonalen Antikörper* mit einer Verdünnung von 1:5000 und nach einem zweiten *Stripping* den *GAPDH (14C10) Rabbit Antikörper* mit einer Verdünnung von 1:1000. Über Nacht wurde die Membran bei 4°C mit dem jeweiligen primären Antikörper inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal für fünf Minuten mit 1 x TBS/T gewaschen

und mit dem sekundären Antikörper für 45 Minuten inkubiert (weiter s. Abschnitt zum sekundären Antikörper).

### **2.2.11 Densitometrie und Normalisierung**

Die Densitometrie ist ein Verfahren, um die Bandenstärke der Western Blots zu quantifizieren. Hierfür wurden mit der Computersoftware *Image Lab<sup>TM</sup>* die Volumina aller Banden gemessen. Anschließend wurden die Bandenstärken von wnt5a und NF- $\kappa$ B mithilfe der Ladekontrolle GAPDH normalisiert. Dafür wurden die Volumina von wnt5a bzw. NF- $\kappa$ B durch die Volumina der Ladekontrolle GAPDH dividiert und in Prozent (%) angegeben.

### **2.2.12 Bioelektrische Impedanzanalyse (BIA)**

Die BIA ist eine elektrische Widerstandsmessung in menschlichen Körpern und dient der Bestimmung der Körperzusammensetzung.







Über je zwei Hautelektroden, die an der rechten Hand und am rechten Fuß angelegt sind, wird ein Wechselstromfeld in der Person erzeugt und der Gesamtwiderstand gemessen.

Der Gesamtwiderstand besteht aus der Resistance und der Reactance. Aus diesen beiden Parametern, dem Phasenwinkel und weiteren personenbezogenen Daten wie der Körpergröße, dem Körpergewicht, dem Geschlecht und dem Alter kann die Körperzusammensetzung berechnet werden. Dafür wurde die Software *NutriPlus<sup>©</sup>* verwendet (47).

### **2.2.13 Ernährungsfragebogen**

Der verwendete Verzehrhäufigkeitsfragebogen, entwickelt von der Abteilung Epidemiologie des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke, ©2013-2015, *ffq2 Revision:4162*, umfasst die Ernährung der vergangenen 12 Monate. In dem Fragebogen geht es um eine subjektive Einschätzung wie häufig bestimmte Nahrungsmittel pro Tag, Woche oder Monat gegessen wurden (s. Abb. 10). Die jeweils

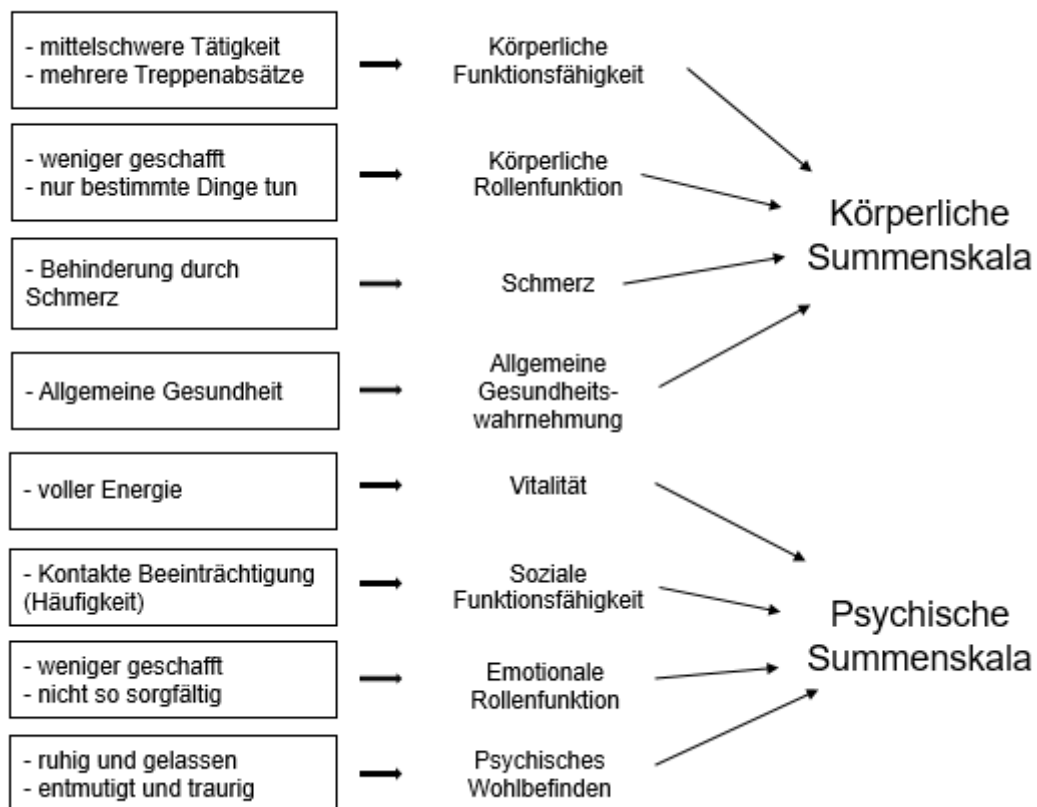
zutreffende Antwort wurde von den Probanden mit einem Kreuz markiert. Mithilfe der Software *EBISpro* wurden die für uns relevanten Lebensmittel herausgefiltert, in denen die  $\omega$ -3-FS EPA und DHA enthalten sind. Zu diesen Lebensmitteln gehören Fische, Fischzubereitungen und Meeresfrüchte sowie Geflügelfleisch und Eier. Mit *EBISpro* konnte anhand des Fragebogens berechnet werden, wie viel EPA und DHA die Probanden pro Monat durchschnittlich zu sich genommen haben.

Ei, gekocht (1 ganzes)		<input type="radio"/> Nie <input type="radio"/> 1 mal pro Monat oder seltener <input type="radio"/> 2-3 mal pro Monat	<input type="radio"/> 1-2 mal pro Woche <input type="radio"/> 3-4 mal pro Woche <input type="radio"/> 5 mal pro Woche oder häufiger
Ei, gebraten (z.B. Omelette, Spiegel- oder Rührei) (1 ganzes)		<input type="radio"/> Nie <input type="radio"/> 1 mal pro Monat oder seltener <input type="radio"/> 2-3 mal pro Monat	<input type="radio"/> 1-2 mal pro Woche <input type="radio"/> 3-4 mal pro Woche <input type="radio"/> 5 mal pro Woche oder häufiger
Geflügelfleisch (1 Portion)		<input type="radio"/> Nie <input type="radio"/> 1 mal pro Monat oder seltener <input type="radio"/> 2-3 mal pro Monat	<input type="radio"/> 1-2 mal pro Woche <input type="radio"/> 3 mal pro Woche oder häufiger
Fisch, frisch, Konserven (z.B. Hering, Thun- fisch, Lachs, Seelachs, Fo- relle) (1 Portion)		<input type="radio"/> Nie <input type="radio"/> 1 mal pro Monat oder seltener <input type="radio"/> 2-3 mal pro Monat	<input type="radio"/> 1-2 mal pro Woche <input type="radio"/> 3 mal pro Woche oder häufiger
Fischzubereitung (z.B. Fischstäbchen, Schlemmerfilet) (1 Portion)		<input type="radio"/> Nie <input type="radio"/> 1 mal pro Monat oder seltener <input type="radio"/> 2-3 mal pro Monat	<input type="radio"/> 1-2 mal pro Woche <input type="radio"/> 3 mal pro Woche oder häufiger
Meeresfrüchte (z.B. Shrimps, Tintenfisch, Muscheln) (1 Portion)		<input type="radio"/> Nie <input type="radio"/> 1 mal pro Monat oder seltener <input type="radio"/> 2-3 mal pro Monat	<input type="radio"/> 1-2 mal pro Woche <input type="radio"/> 3 mal pro Woche oder häufiger

**Abbildung 10: Relevante Fragen aus dem Verzehrhäufigkeitsfragebogen** (Abteilung Epidemiologie des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke, ©2013-2015, ffq2Revision:4162).

### 2.2.14 Short Form (SF)-12 Gesundheitsfragebogen

SF-12, die kurze Version von SF-36, ist ein standardisierter und krankheitsunspezifischer Fragebogen zur Erfassung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität. Von den 36 Punkten wurden 12 für den SF-12 ausgewählt. In dem SF-12 sind jeweils acht Dimensionen der gesundheitsbezogenen Lebensqualität enthalten. Je zwei Punkte befassen sich mit der körperlichen Funktionsfähigkeit, der körperlichen Rollenfunktion, der emotionalen Rollenfunktion und dem psychischen Wohlbefinden. Mit Schmerzen, der allgemeinen Gesundheitswahrnehmung, der Vitalität und der sozialen Funktionsfähigkeit befasst sich jeweils ein Punkt (48).



**Abbildung 11: Punkte vom SF-12** ( modifizierte Abbildung, 49,50).

Die vier Bereiche Körperliche Rollenfunktion, Schmerz, allgemeine Gesundheitswahrnehmung und Körperliche Funktionsfähigkeit lassen sich zur Körperlichen Summenskala (KSK) zusammenfassen. Die anderen vier Bereiche Vitalität, soziale Funktionsfähigkeit, emotionale Rollenfunktion und psychisches

Wohlbefinden lassen sich zur Psychischen Summenskala (PSK) zusammenfassen (s. Abb. 11) (49,50).

SF-12 wurde mithilfe eines Auswertungsbogens manuell ausgewertet. Zunächst wurden Dummy Variablen berechnet, die anschließend mithilfe von vorgegebenen Variablen gewichtet wurden. Die gewichteten Dummy Variablen wurden miteinander und mit einer vorgegebenen Konstante addiert, sodass man einen Endwert für die PSK und einen Endwert für die KSK erhielt. Je höher die Summe, desto besser ist die körperliche oder die psychische Verfassung der Probanden.

### 2.2.15 FoCus-Kohorte

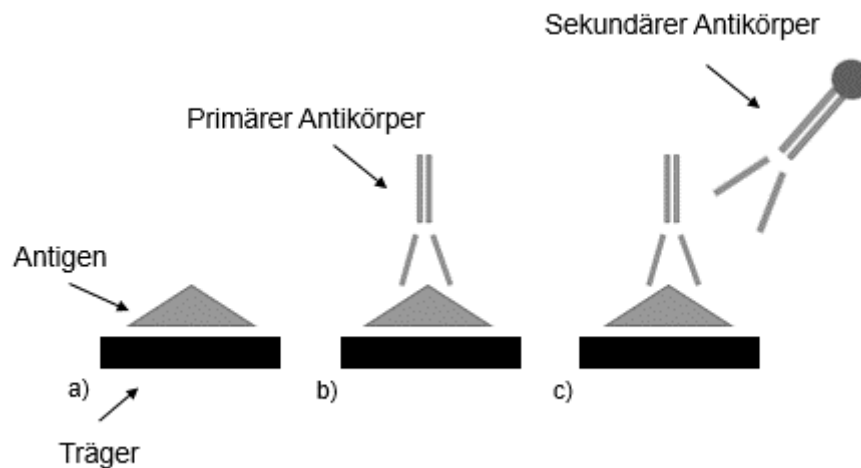
Für das Food Chain Plus (FoCus) Projekt wurden von 2011 bis 2014 insgesamt  $n = 2.000$  gesunde Probanden rekrutiert. Das FoCus Projekt wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt und alle Probandinnen und Probanden wurden ausführlich aufgeklärt und haben schriftlich in die Studienteilnahme eingewilligt. Sie durchliefen ein internistisches und ernährungsspezifisches medizinisches Programm zur Phänotypisierung. Es wurden antropometrische Daten erhoben, metabolische und inflammatorische Marker in Blutproben analysiert und Informationen zur Ernährung über den Verzehrhäufigkeitsfragebogen *ffq2 Revision:4162* gewonnen. Bei  $n = 896$  Probanden wurden die *wnt5a* Konzentrationen im Serum mittels ELISA bestimmt. Von diesen 896 Probanden wurden für die Berechnungen in dieser Arbeit alle Probanden mit einem BMI zwischen 18,5 und 29,9 kg/m<sup>2</sup> ausgewählt. So ergab sich eine Studienteilpopulation von  $n = 466$  Probanden.

### 2.2.16 ELISA

ELISA, *enzyme linked immunosorbent assay*, ist ein Immunassay zur Bestimmung der Konzentrationen von Antigenen. Das nachzuweisende Antigen wird zunächst an einen Träger, beispielsweise einen Antikörper, gebunden. Anschließend gibt man einen antigenspezifischen primären Antikörper hinzu, der an das Antigen bindet. In einem letzten Schritt wird ein sekundärer Antikörper hinzugefügt, der an den primären Antikörper bindet. Dieser Antikörper ist z.B. an eine alkalische Phosphatase oder



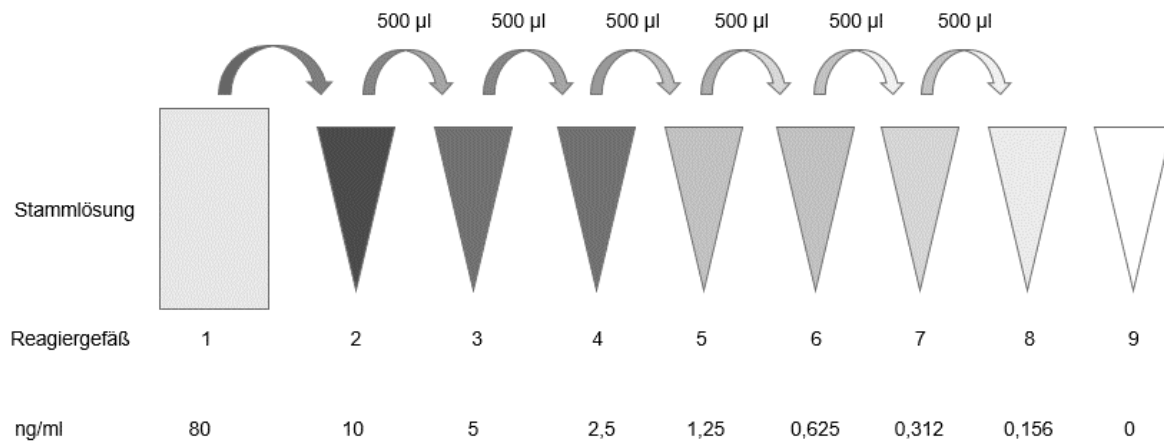
Peroxidase gekoppelt, sodass ein kalorimetrischer Nachweis durch die Umsetzung eines Substrates möglich ist (s. Abb. 12) (51).



**Abbildung 12: Prinzip eines ELISAs.** a) Das zu bestimmende Antigen ist an einen Träger gebunden (z.B. einen Antikörper). b) Ein primärer Antikörper wird hinzugefügt und bindet an das Antigen. c) Ein sekundärer Antikörper, der an den primären Antikörper bindet, wird hinzugefügt. An ihm ist ein Enzym (z.B. Peroxidase) gekoppelt, durch welches ein kalorimetrischer Nachweis und die Bestimmung der Antigenkonzentration möglich ist (modifizierte Darstellung, 51).

Um einen ELISA durchführen zu können, wurden zunächst die Reagenzien und die Proben vorbereitet. Dafür wurden sie auf Raumtemperatur (18-25°C) gebracht und eine Standardlösung mit 1 ml Standardverdünnung hergestellt. Die Konzentration in dieser Stammlösung betrug 80 ng/ml, die anschließend auf 10 ng/ml verdünnt wurde.

Anschließend bereitete man sieben Reagiergefäße, die jeweils 0,5 ml Standardverdünnung beinhalteten, vor. Es wurde eine doppelte Verdünnungsreihe hergestellt (s. Abb. 13). Jedes Reagiergefäß wurde vor dem nächsten Transfer vorsichtig geschüttelt. Es entstanden verdünnte Standards in den Konzentrationen



**Abbildung 13: Herstellung der verdünnten Standardlösungen**

(modifizierte Darstellung, Anleitung ELISA Kit).

10 ng/ml, 5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,625 ng/ml, 0,312 ng/ml, 0,156 ng/ml und eine Blankolösung mit 0 ng/ml.

Zur Präparation der Nachweisreagenzien A und B wurden die jeweiligen Stammlösungen zentrifugiert und anschließend zur Arbeitslösung 100-fach mit Assay Diluent A und B verdünnt.

Die Waschlösung entstand durch Verdünnung von 20 ml Waschlösung mit 580 ml destilliertem Wasser.

Für die Testung wurden Titerplatten verwendet. Für die Verdünnungsstandards, die Blankolösung und die Proben wurden *Wells* definiert und insgesamt sieben *Wells* für den Standard und ein *Well* für die Blankolösung vorbereitet. In jedes *Well* fügte man 100 µl von jedem verdünnten Standard, dem Blanko oder den Proben hinzu. Anschließend bedeckte man die Platte mit einer Versiegelungsfolie und inkubierte sie für eine Stunde bei 37°C. Die Flüssigkeit wurde entfernt und anschließend wurden in jedes *Well* 100 µl der Arbeitslösung des Nachweisreagenzes A hinzugefügt. Die Platte wurde wieder mit einer Folie bedeckt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Im nächsten Schritt führte man insgesamt drei Waschdurchgänge à ein bis zwei Minuten mit jeweils 350 µl Waschlösung pro *Well* durch.

100 µl der Arbeitslösung des Nachweisreagenzes B wurden in jedes *Well* hinzugefügt, die Platte mit einer Folie versiegelt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Den Waschprozess wiederholte man anschließend insgesamt fünf Mal.

Es wurden 90 µl Substratlösung in jedes *Well* pipettiert und die Platte erneut mit einer Folie abgedeckt und für 10 bis 20 min bei 37°C lichtgeschützt inkubiert. 50 µl einer Stop-Lösung wurden hinzugefügt und die Flüssigkeiten durch Tippen der Platte auf den Untergrund gemischt. Der Titerplattenleser und die Messung wurden auf 450 nm eingestellt.

### **2.2.17 Statistische Analysen**

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Softwares Excel 2013 und SPSS 24. Da die einzelnen Stichproben nicht größer  $n = 10$  waren, wurde davon ausgegangen, dass die Daten nicht normalverteilt/parametrisch sind. Auch die Daten der FoCus-Kohorte waren nicht normalverteilt. Die Mediane, die 25. und 75. Perzentile wurden ermittelt. Um die statistische Signifikanz zwischen zwei verbundenen Stichproben zu ermitteln, wurde der Wilcoxon-Test verwendet. Für zwei unabhängige Stichproben verwendete man den Mann-Whitney-U Test. Die Korrelationen wurden anhand des Spearman-Korrelationskoeffizienten ermittelt. Das Signifikanzniveau lag bei  $p \leq 0,05$ .

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Studienpopulation

In die Studie wurden zwischen Mai 2015 und August 2017 18 Probanden mit einem gastrointestinalen oder urologischen Karzinom eingeschlossen. Die Aufteilung erfolgte randomisiert in eine Gruppe mit  $\omega$ -3-FS und eine Gruppe ohne („-“)  $\omega$ -3-FS. Die Gruppen mit und ohne  $\omega$ -3-FS unterscheiden sich darin, dass die Probanden die Trinknahrungen unterschiedlich lange eingenommen haben. Die Gruppe mit  $\omega$ -3-FS hat die Trinknahrung im Median 14 Tage eingenommen. Die Gruppe ohne  $\omega$ -3-FS 10,5 Tage ( $p < 0,05$ ) (s. Tabelle 13).

**Tabelle 13: Patientencharakteristika**

	$\omega$ -3-FS		p	„-“ $\omega$ -3-FS		p
	t <sub>0</sub>	t <sub>2</sub>		t <sub>0</sub>	t <sub>2</sub>	
<b>Fallzahl</b>	10			8		
<b>Alter</b>	71,5 (62,75;77,75)			69,5 (61;79,75)		
<b>Gewicht (kg)</b>	76,5 (65,75;87,68)	76,5 (66,25;89,88)	0,07	71,55 (62,25;78,58)	72 (63,48;79,25)	0,046
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	26,75 (22,58;28,28)	26,95 (21,3;28,4)	0,09	24,45 (21,65;25,73)	24,7 (21,75;25,78)	0,07
<b>Tage der Einnahme</b>	14 (12,25;14)			10,5 (7,13;12,75)		
<b><math>\omega</math>-3-FS (g/Monat)</b>	4,05 (2,07;4,38)			6,52 (3,3;8,12)		

In der Gruppe mit  $\omega$ -3-FS wurde bei zwei Patienten ein Urothelkarzinom der Blase (pT1, G3, N0 und pT2a, pN0, L0, V0, Pn0, pR0) diagnostiziert, bei drei Patienten ein Adenokarzinom des gastroösophagealen Übergangs (pT2, pN1, L1, V0, Pn0, pR0; pT2, pN0, L0, V0, Pn0, pR0; uT3, N3, M0), bei drei Patienten ein Magenkarzinom der Kardia oder des Antrums (ypT2, ypN0, L0, V0, Pn0, ypR0; ypT4a, ypN3a, L1, Vo, Pn0, ypR0; pT1b, pN1, cM0, L1, V0, Pn0, pR0) und bei zwei Patienten ein Pankreaskopfkarzinom (Tumorstadium nicht bekannt, nach explorativer Laparoskopie: inoperabel).

In der Gruppe ohne  $\omega$ -3-FS wurde bei einem Patienten ein Urothelkarzinom der Blase (pT4a, pN3, L1, V0, Pn1, pR0) diagnostiziert, eine Patient litt an ausgeprägter Aszites bei Peritonealkarzinose, bei zwei Patienten wurde ein Adenokarzinom des gastroösophagealen Übergangs (pT1, pN0, L0, V0, Pn0, pR0 und ypT1, ypN0, L0, V0, Pn0, ypR0) diagnostiziert, bei einem Patienten ein Adenokarzinom des distalen Ösophagus (ypT3, ypN0, L0, V0, Pn1, pR0), bei einem Patienten ein Magenkarzinom der Kardia (ypT4a, ypN3b, L1, V1, Pn0, ypR0) und bei zwei Patienten ein Rektumkarzinom (ypT3, ypN2a, L0, M0, V0, Pn0, ypR0 und ypT3a, ypN1c, L0, V0, Pn0, ypR0).

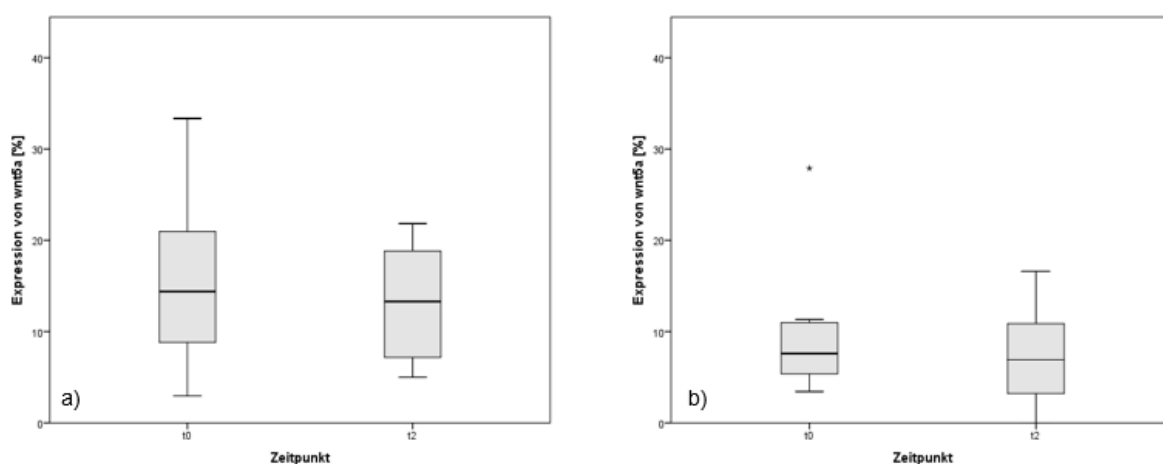
### 3.2 Auswertung der Western Blots

Die Expression von wnt5a ist vom Zeitpunkt  $t_0$  zu  $t_2$  in der Gruppe mit  $\omega$ -3-FS im Median um -2,68% ( $p > 0,05$ ) gesunken. In der Gruppe ohne  $\omega$ -3-FS ist die wnt5a-Expression im Median um 1,06% ( $p > 0,05$ ) gestiegen (s. Tabelle 14 und Abbildung 14).

Die Expression von NF- $\kappa$ B ist vom Zeitpunkt  $t_0$  zu  $t_2$  in der Gruppe mit  $\omega$ -3-FS im Median um -11,86% ( $p > 0,05$ ) gesunken. In der Gruppe ohne  $\omega$ -3-FS ist die NF- $\kappa$ B-Expression im Median um -3,98% ( $p > 0,05$ ) gesunken (s. Tabelle 14 und Abbildung 15).

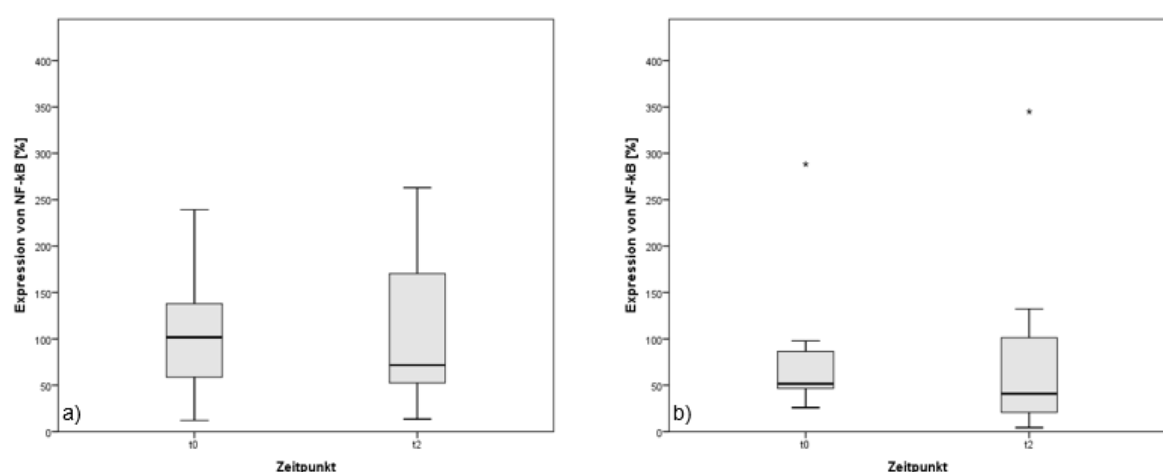
**Tabelle 14: Ergebnisse der Densitometrie von wnt5a und NF- $\kappa$ B zum Zeitpunkt  $t_0$  und  $t_2$ . Darstellung der Mediane mit der 25. und 75. Perzentile. Alle Werte sind in % angegeben.**

	wnt5a $t_0$	wnt5a $t_2$	diff $t_2-t_0$	p	NF- $\kappa$ B $t_0$	NF- $\kappa$ B $t_2$	diff $t_2-t_0$	p
<b><math>\omega</math>-3-FS</b>	14,39 (7,37;21,39)	13,3 (6,99;18,85)	-2,68 (-6,84;2,58)	0,29	101,59 (56,46;161,86)	71,69 (49,1;186,74)	-11,86 (-50,6;27,33)	0,39
<b>„-“ <math>\omega</math>-3-FS</b>	7,59 (3,48;11,32)	6,92 (3,01;11,62)	1,06 (-0,62;2,09)	0,31	51,57 (43,35;97,85)	40,88 (16,55;116,81)	-3,98 (-37,75;56,75)	0,87



**Abbildung 14: Boxplots der Expression von wnt5a [%] zum Zeitpunkt  $t_0$  und  $t_2$  .**

a) Gruppe mit  $\omega$ -3-FS b) Gruppe ohne  $\omega$ -3-FS.

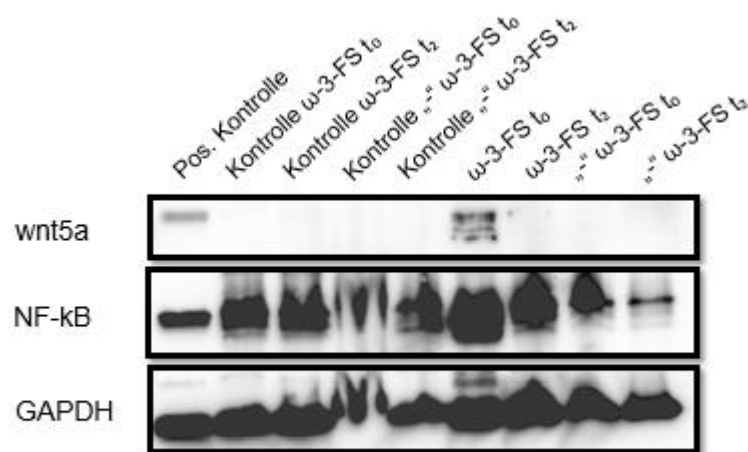


**Abbildung 15: Boxplots der Expression von NF- $\kappa$ B [%] zum Zeitpunkt  $t_0$  und  $t_2$ .**

a) Gruppe mit  $\omega$ -3-FS b) Gruppe ohne  $\omega$ -3-FS.

### 3.3 Showblot

In den unten dargestellten Western Blot Ausschnitten ist jeweils eine Probe der Gruppen mit und ohne  $\omega$ -3-FS zu den Zeitpunkten  $t_0$  und  $t_2$  dargestellt. Die Bilder von wnt5a (45 kDa), NF- $\kappa$ B (50 kDa) und GAPDH (37 kDa) sind nach einer Detektionszeit von 360 Sekunden entstanden.



**Abbildung 16: Showblot.** wnt5a (45kDa), NF- $\kappa$ B (50 kDa) und GAPDH (37 kDa) nach 360 sec.

### 3.4 Auswertung der Bioelektrischen Impedanzanalysen

In der Gruppe ohne  $\omega$ -3-FS ist das Gewicht im Median von 71,55 kg (62,25 kg; 78,58 kg) auf 72 kg (63,48 kg; 79,25 kg) ( $p = 0,046$ ) angestiegen, der Grundumsatz ist von 1435 kcal (1250 kcal; 1468 kcal) auf 1460 kcal (1275 kcal; 1545 kcal) ( $p = 0,035$ ) und das Körperfett ist von 15,4 kg (14,1 kg; 20,2 kg) auf 16 kg (14,55 kg; 23,05 kg) ( $p = 0,043$ ) angestiegen. Die weiteren Parameter haben sich statistisch nicht signifikant geändert.

In der Gruppe mit  $\omega$ -3-FS haben sich die gemessenen Parameter der BIA vom Zeitpunkt  $t_0$  zum Zeitpunkt  $t_2$  nicht signifikant geändert (s. Tabelle 15).

**Tabelle 15: Ergebnisse der BIA zum Zeitpunkt  $t_0$  und  $t_2$ . Darstellung der Mediane und der 25. und 75. Perzentile.**

	$\omega$ -3-FS		p	$\omega$ -3-FS		p
	$t_0$	$t_2$		$t_0$	$t_2$	
<b>Grundumsatz (kcal)</b>	1460 (1330;1592)	1435 (1375;1553)	0,4	1435 (1250;1468)	1460 (1275;1545)	0,035
<b>Körperwasser (l)</b>	41,7 (38,2;47,38)	42 (38,2;49,23)	0,58	42,25 (33,03;44,3)	43,2 (33,25;46,33)	0,33
<b>Magermasse (kg)</b>	56,95 (52,15;64,73)	57,4 (52,15;67,23)	0,58	57,75 (45,05;60,55)	59 (45,4;63,23)	0,33
<b>BZM (kg)</b>	26,75 (22,43;31,03)	25,8 (23,93;29,55)	0,61	25,9 (19,98;26,88)	26,65 (21,29;45)	0,035
<b>EZM (kg)</b>	31,7 (29,33;35,83)	31,75 (28,9;35,33)	1	31,35 (26,35;33,88)	32,3 (23,75;33,93)	1
<b>Zellanteil (%)</b>	46,2 (39,58;48,43)	45,95 (42,5;46,6)	0,74	44,3 (42,43;46,08)	46,5 (44,63;48,3)	0,18
<b>Körperfett (kg)</b>	19,4 (9,9;28,65)	20,1 (9,5;29,45)	0,058	15,4 (14,1;20,2)	16 (14,55;23,05)	0,043
<b>IZW (l)</b>	24,3 (21,93;27,08)	24,45 (21,93;27,38)	0,4	24,75 (20,48;25,45)	25,6 (20,23;26,4)	0,06
<b>EZW (l)</b>	17,5 (16,23;20,53)	17,6 (16,25;21,83)	0,78	17,5 (12,95;18,85)	18,1 (12,6;19,93)	0,48
<b>Phasenwinkel (°)</b>	4,9 (3,95;5,3)	4,9 (4,35;5)	0,73	4,6 (4,35;4,93)	5 (4,63;5,25)	0,14

*BZM (Muskel- und Organzellmasse), EZM (Interstitium, Knochen, Bindegewebe), IZW (Intrazelluläres Wasser), EZW (extrazelluläres Wasser)*

### 3.5 Auswertung der SF-12 Fragebögen

In der Gruppe mit  $\omega$ -3-FS sowie der Gruppe ohne  $\omega$ -3-FS blieb die KSK im Median mit 0 Punkten ( $p > 0,05$ ) vom Zeitpunkt  $t_0$  zum Zeitpunkt  $t_2$  unverändert. (s. Tabelle 16 und Abbildung 17).

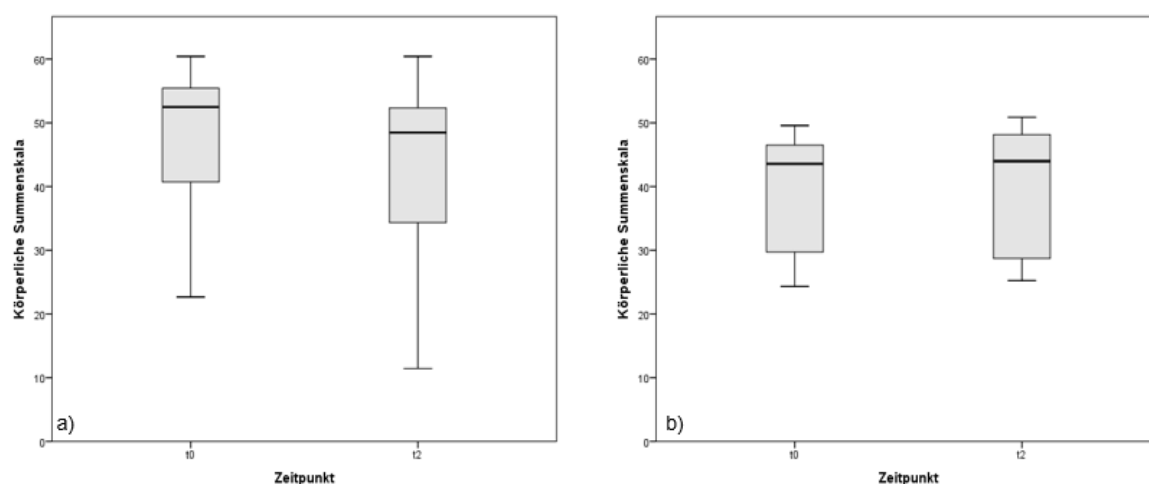
Die Summe der PSK hat sich in der Gruppe mit  $\omega$ -3-FS im Median mit 0 Punkten ( $p > 0,05$ ) nicht verändert. In der Gruppe ohne  $\omega$ -3-FS ist die Summe um 1,34 Punkte ( $p = 0,046$ ) angestiegen (s. Tabelle 16 und Abbildung 18).



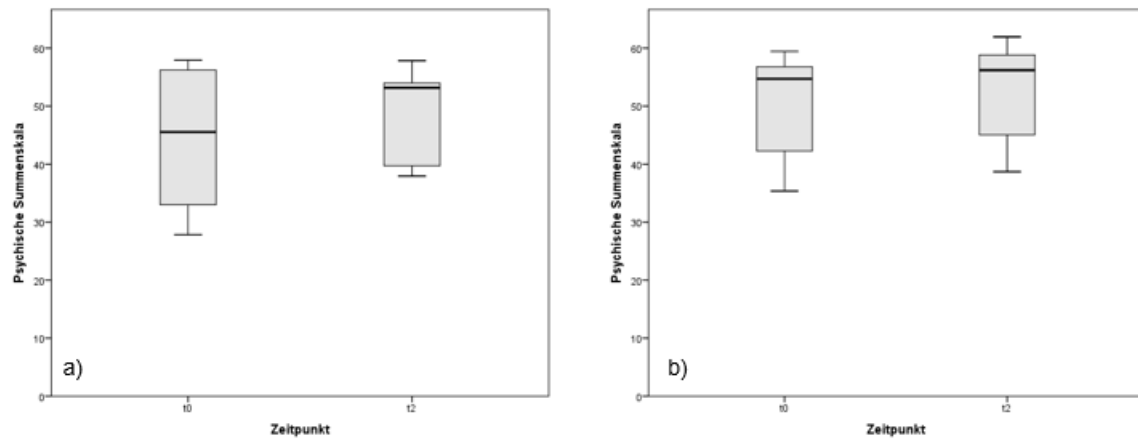
**Tabelle 16: Ergebnisse der SF-12 Fragebögen zum Zeitpunkt  $t_0$  und  $t_2$ .**

Darstellung der Mediane mit der 25. und 75. Perzentile und der Differenz vom Zeitpunkt  $t_2$  zum Zeitpunkt  $t_0$ .

	KSK $t_0$	KSK $t_2$	diff $t_2-t_0$	p	PSK $t_0$	PSK $t_2$	diff $t_2-t_0$	p
<b><math>\omega</math>-3-FS</b>	52,48 (36,21;56,68)	48,46 (27,98;53,91)	0 (-1,52;14,27)	0,59	45,55 (31,72;56,64)	53,17 (38,05;54,78)	0 (-0,76;6,77)	1
<b>„-“ <math>\omega</math>-3-FS</b>	43,56 (29,23;47,36)	43,99 (28,72;48,86)	0 (-1,23;3,64)	0,75	54,71 (40,48;57,2)	56,21 (43,44;59,04)	1,34 (0;5,45)	0,046



**Abbildung 17: Boxplots der Ergebnisse der Körperlichen Summenskala zum Zeitpunkt  $t_0$  und  $t_2$ . a) Gruppe mit  $\omega$ -3-FS b) Gruppe ohne  $\omega$ -3-FS.**



**Abbildung 18: Boxplots der Ergebnisse der Psychischen Summenskala zum Zeitpunkt  $t_0$  und  $t_2$ . a) Gruppe mit  $\omega$ -3-FS b) Gruppe ohne  $\omega$ -3-FS.**

### 3.6 Auswertungen der FoCus-Daten

#### 3.6.1 Studienpopulation

Die Studienpopulation setzt sich aus  $n = 466$  Probandinnen und Probanden zusammen, die aus der FoCus-Kohorte stammen. Es wurden alle Probanden und Probandinnen von den ursprünglich  $n = 2.000$  eingeschlossen, bei denen die wnt5a Serumkonzentrationen bestimmt wurden und bei denen ein BMI zwischen 18,5 und 29,9 kg/m<sup>2</sup> gemessen wurde. Die anthropometrischen Daten der Studienpopulation sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

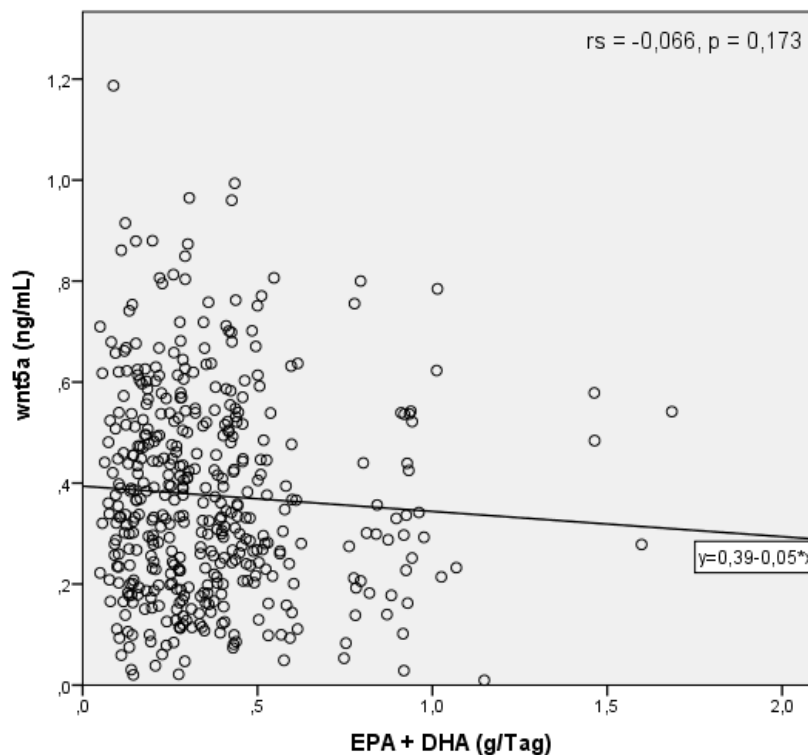
**Tabelle 17: Daten der FoCus Teilpopulation (n=466)**

	<b>Männer</b>	<b>Frauen</b>	<b>Gesamt</b>
<b>n</b>	197 (42,3%)	269 (57,7%)	466
<b>Alter</b>	57 (44;68)	50 (40;63)	52 (42;65)
<b>Gewicht (kg)</b>	84,4 (75,85;90,9)	67 (60,25;75,3)	74,05 (65,18;84,43)
<b>Größe (cm)</b>	180 (175;184)	169 (164;173)	173 (168;180)
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	26 (23,48;27,7)	23,56 (21,62;26,02)	24,59 (22,26;27,1)
<b>wnt5a (ng/ml)</b>	0,33 (0,21;0,52)	0,37 (0,23;0,52)	0,35 (0,22;0,52)
<b>EPA (g/Tag)</b>	0,16 * (0,076;0,19)	0,088 ** (0,038;0,12)	0,097 (0,05;0,17)
<b>DHA (g/Tag)</b>	0,26 * (0,18;0,33)	0,179 ** (0,12;0,24)	0,2 (0,13;0,28)
<b>EPA+DHA (g/Tag)</b>	0,41 * (0,26;0,52)	0,26** (0,15;0,35)	0,29 (0,19;0,44)

\* 16 fehlen, \*\* 19  
fehlen

### 3.6.2 Assoziation zwischen den wnt5a Konzentrationen und der $\omega$ -3-FS Zufuhr

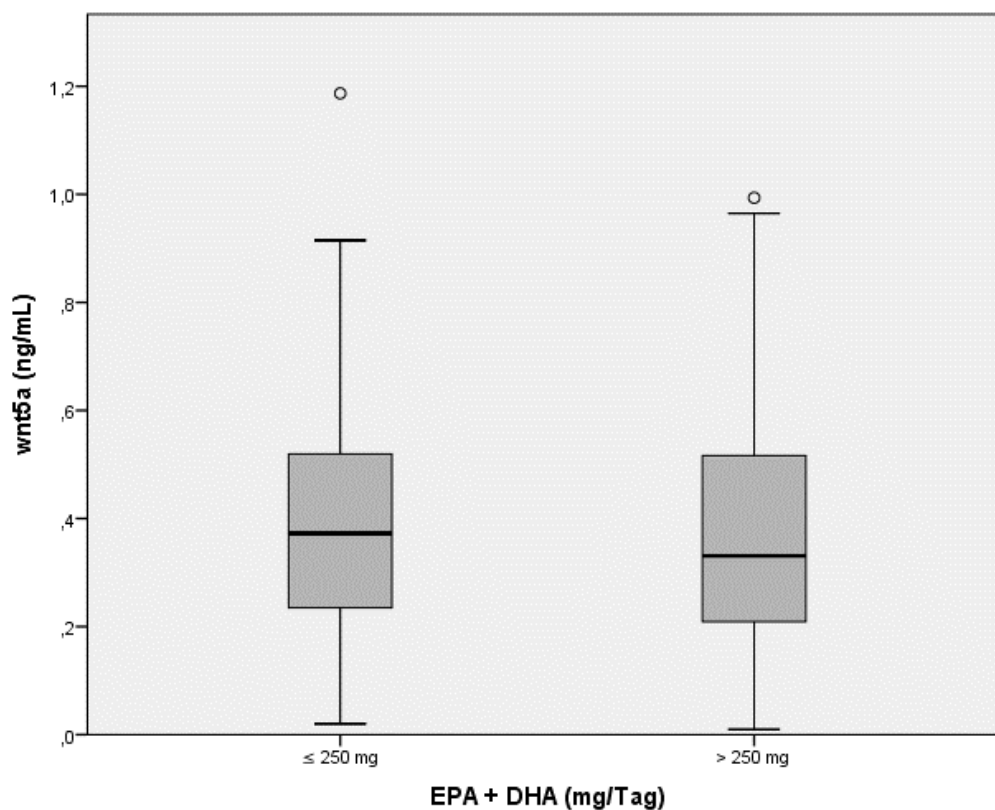
Die Korrelation zwischen der täglichen Aufnahme der  $\omega$ -3-FS EPA und DHA und den wnt5a Konzentration im Serum wurde durchgeführt, um die Stärke der Beziehung zueinander zu zeigen (s. Abb. 19). Es konnte statistisch keine signifikante Assoziation beobachtet werden ( $r_s = -0,066$ ,  $p = 0,173$ ).



**Abbildung 19: Korrelation zwischen der Zufuhr von  $\omega$ -3-FS und wnt5a Serumkonzentrationen.** Punktediagramm einer Spearman Korrelation zwischen der täglichen Einnahme von EPA und DHA (g/Tag) und der wnt5a Serumkonzentration (ng/ml) ( $r_s = -0,066$ ,  $p = 0,173$ ).

### 3.6.3 Vergleich der wnt5a Serumkonzentration bei hoher (> 250 mg/d) und niedriger ( $\leq$ 250 mg/d) täglicher $\omega$ -3-FS Zufuhr

Die wnt5a Konzentrationen im Serum wurden je nach täglicher  $\omega$ -3-FS Einnahme miteinander verglichen (s. Abb. 20). Die wnt5a Konzentrationen waren in der Gruppe mit der höheren Zufuhr (> 250 mg/d) ( $n = 271$ ) nicht signifikant niedriger als in der Gruppe mit der geringeren Zufuhr ( $\leq$  250 mg/d) ( $n = 160$ ) ( $p = 0,189$ ).



**Abbildung 20: Vergleich der wnt5a Serumkonzentrationen bei niedriger und hoher täglicher Zufuhr von  $\omega$ -3-FS.** Niedrige tägliche Zufuhr ( $\leq 250$  mg/d) ( $n = 160$ ) verglichen mit einer hohen Zufuhr (> 250 mg/d) ( $n = 271$ ) ( $p = 0,189$ ). Die statistische Signifikanz wurde mithilfe des Mann-Whitney U Tests berechnet.

## 4. Diskussion

### 4.1 Allgemeines

Es ist allgemein bekannt, dass eine gesunde und ausgewogene Ernährung wie zum Beispiel eine mediterrane Ernährung gut für die Gesundheit ist und umgekehrt eine schlechte Ernährung, die unter anderem einen hohen Zuckerkonsum beinhaltet, sich negativ bei Tumorerkrankungen auswirkt und das Tumorwachstum anregt.

Doch insgesamt gibt es wenige große randomisierte Studien zum Thema Ernährung und Ernährungssupplementierung. Daraus resultiert die Schwierigkeit, Ergebnisse sinnvoll vergleichen zu können und Resultate daraus zu ziehen.

Eine der größten Studien zum Thema Ernährung bzw. zur mediterranen Diät in den letzten Jahren ist die PREDIMED Studie, die 2013 im *New England Journal of Medicine* von *Estruch et al.* veröffentlicht wurde. Es handelt sich um eine randomisierte, multizentrale Studie mit einem parallelen Gruppendesign, die in Spanien durchgeführt wurde. Von 2003 bis 2010 wurden insgesamt 7.447 Personen mit hohem kardiovaskulären Risiko in die Studie eingeschlossen und randomisiert 1:1:1 auf drei Studienarme aufgeteilt. Die erste Gruppe erhielt eine mediterrane Diät, die mit nativem Olivenöl extra (ca. 1 Liter pro Woche) supplementiert war, die zweite eine mediterrane Diät, die mit Nüssen (15 g Walnüssen, 7,5 g Haselnüssen und 7,5 g Mandeln pro Tag) supplementiert war und die dritte Gruppe führte eine fettarme Kontrolldiät durch. Die Studie endete nach durchschnittlich 4,8 Jahren. Bei dem primären Endpunkt handelte es sich um die Rate der kardiovaskulären Ereignisse (Myokardinfarkt, Schlaganfall, Tod durch kardiovaskuläre Ursache). In der ersten Gruppe trat bei 96 Personen ein Ereignis auf, dass zum primären Endpunkt führte, in der zweiten Gruppe bei 83 Personen und in der Kontrollgruppe bei 109 Personen. Dies entspricht einer absoluten Risikoreduktion von drei kardiovaskulären Ereignissen pro 1.000 Personenjahren und einer relativen Risikoreduktion von 30% bei Personen, die ein hohes kardiovaskuläres Risiko haben und noch frei von kardiovaskulären Ereignissen sind. Dabei gibt es statistisch keinen signifikanten Unterschied zwischen der mediterranen Diät, die durch das native Olivenöl extra erweitert wurde und der, die durch die Nussmischung erweitert wurde (52).

## 4.2 Präoperative orale Nahrungssupplementierung mit Trinknahrungen und präoperative Immunonutrition

In der S3-Leitlinie der deutschen Gesellschaft für Ernährungsmedizin (DGEM) wird eine präoperative Nahrungssupplementierung mit Trinknahrungen empfohlen. Dabei wird zwischen einer oralen Nahrungssupplementierung mit einer enteralen Standardtrinknahrung und der Immunonutrition mit einer immunmodulierenden Trinknahrung unterschieden. Die DGEM empfiehlt, wann immer möglich, eine orale Nahrung einer enteralen oder parenteralen Nahrung vorzuziehen. Es sollte jedem Patienten, dem eine allgemeinchirurgische Operation bevorsteht, eine präoperative Trinknahrung angeboten werden, da Patienten ihren Energiebedarf präoperativ nicht adäquat decken (53). *Smedley et al.* zeigen in ihrer Studie eine signifikante Reduktion an geringen perioperativen Komplikationen sowie eines postoperativen Gewichtsverlustes, unabhängig vom Ernährungszustand des Patienten (53,54).

Bei der Immunonutrition handelt es sich um Trinknahrungen, denen immunmodulierende Substrate wie Arginin,  $\omega$ -3-FS (55), Nukleotide (56) und Glutamin beigefügt sind (55,57,58). Die DGEM empfiehlt ihren Einsatz bei Tumorpatienten vor einer großen abdominalchirurgischen Operation vom Magen, Ösophagus, Pankreas, Rektum oder von der Leber über fünf bis sieben Tage (53), um das Immunsystem zu stabilisieren (59,60).

Besonders mangelernährte Patienten profitieren von dem Einsatz dieser Trinknahrungen (61). Bei ihnen wird eine präoperative Ernährungsunterstützung über 10 bis 14 Tagen empfohlen (56).

$\omega$ -3-FS haben eine entzündungshemmende Wirkung. Sie wirken immunmodulierend und durchblutungsfördernd. Arginin verbessert die zelluläre Immunantwort, die Proteinsynthese und damit auch die Wundheilung. Ribonukleinsäuren stärken den Darm in seiner Barrierefunktion gegen unerwünschte Bakterien (56). Durch orale, enterale sowie parenterale Ernährung sollen überschießende Entzündungsreaktionen eingedämmt werden und Immunfunktionen verbessert und stabilisiert werden (56,57). Durch eine präoperative Intervention soll eine bessere postoperative zelluläre Immunität (55,62) und eine bessere Durchblutung des Darmgewebes erzielt werden. Dadurch sollen Folgen der Ischämie wie Nekrosen und Anastomoseninsuffizienzen vermindert (62) und die postoperative Infektionsrate gesenkt werden (55).

Studien zeigen, dass die postoperative Infektionsrate und die Länge der Krankenhausverweildauer signifikant reduziert werden konnten (55,63). Ansonsten konnten Behandlungsvorteile, die man sich durch Immunonutrition erhofft, bis jetzt in großen placebokontrollierten randomisierten Studien noch nicht ausreichend geklärt werden (57).

Die BIA ist ein nicht-invasives Verfahren zur Messung der Körperzusammensetzung. Mit ihrer Hilfe kann eine Aussage über den Ernährungszustand der Probanden getroffen werden. Eine Aussage über den Gesundheitszustand des Organismus kann vor allem durch die direkte Messung des Phasenwinkels getroffen werden. Er ist eine sehr aussagekräftige Größe, da er nicht mithilfe anderer Parameter berechnet wird. Dabei sprechen ein hoher Phasenwinkel für gut ernährte Zellen und ein niedriger Phasenwinkel für schlecht ernährte Zellen. Der Normalbereich des Phasenwinkels liegt zwischen  $5^\circ$  bzw.  $5,5^\circ$  und  $7,5^\circ$  bzw.  $9^\circ$ . Ist der Phasenwinkel  $< 5^\circ$  spricht dies für eine Mangelernährung (64,65).

Die Patienten unserer Studie waren zu Beginn mangelernährt. Bei der Gruppe, die die Trinknahrung mit den  $\omega$ -3-FS zu sich genommen hat, wurde im Median ein Phasenwinkel von  $4,9^\circ$  gemessen. Der Phasenwinkel hat sich durch die Einnahme der Trinknahrung jedoch nicht verändert. In der Gruppe, die die Standardtrinknahrung eingenommen hat, ist der Phasenwinkel von  $4,6^\circ$  auf  $5^\circ$  ( $p > 0,05$ ) gestiegen.

Somit konnte keine eindeutige Steigerung des Phasenwinkels und damit keine eindeutige Besserung des Ernährungszustandes der Zellen und des Organismus durch zweiwöchige Einnahme der präoperativen Nahrungssupplementierung gezeigt werden.

#### **4.3 Kontroverse Ergebnisse zu $\omega$ -3-FS**

In der Literatur wird die Wirkung der  $\omega$ -3-FS kontrovers diskutiert. In vielen Studien geht die enterale Gabe von EPA und DHA bzw. von Fischöl mit einem Abfall von pro-inflammatorischen Biomarkern (z.B. IL-8, NF- $\kappa$ B) einher. Einige Studien zeigen eine Steigerung der beatmungs- sowie der intensivstationsfreien Tage, die Anzahl an



Organversagen und die Mortalität sinken im Vergleich zu Kontrollgruppen ohne  $\omega$ -3-FS (66).

Andere Studien zeigen gegenteilige Ergebnisse. In der *OMEGA-Studie*, einer großen randomisierten kontrollierten Phase III Studie und in einer randomisierten placebokontrollierten Phase II Studie über  $\omega$ -3-FS zur Behandlung von ALI (*acute lung injury*) konnte keine Reduktion von inflammatorischen Biomarkern wie IL-6 und IL-8 beobachtet werden. In der OMEGA-Studie gab es statistisch signifikant weniger beatmungs- und intensivstationsfreie Tage und weniger freie Tage ohne nicht-pulmonalem Organversagen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die 60-Tages Mortalität ist im Vergleich zur Kontrollgruppe angestiegen, wenn auch nicht signifikant (67,68).

In der *OMEGA-Studie*, 2012 publiziert von Schott *et al.* in *Critical care*, wurden 272 Patienten mit ALI eingeschlossen. 143 Patienten haben zweimal täglich eine enterale Gabe von  $\omega$ -3-FS, Gamma-Linolensäure und Antioxidantien erhalten. Die 129 Patienten in der Kontrollgruppe erhielten eine isokalorische Lösung. Die Studie wurde, bevor die geplanten 1.000 Patienten eingeschlossen waren, vorzeitig beendet. In der Studie konnte bei den Patienten, die  $\omega$ -3-FS bekamen, signifikant weniger beatmungsfreie Tage ( $p = 0,02$ ), weniger intensivstationsfreie Tage ( $p = 0,04$ ) und weniger Tage mit nicht-pulmonalem Organversagen ( $p = 0,02$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Die 60-Tages Mortalität war in der  $\omega$ -3-FS Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant höher ( $p = 0,11$ ). Trotz eines Anstieges des EPA-Serumlevels in der Behandlungsgruppe konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen in den Serumlevels der pro-inflammatorischen Mediatoren IL-6 und IL-8 gemessen werden ( $p = 0,47$ ). Es wird diskutiert, ob  $\omega$ -3-FS nicht nur nicht von Nutzen seien, sondern sogar schädlich für Patienten mit ALI (67).

Auch in der randomisierten placebokontrollierten Phase II Studie zu  $\omega$ -3-FS zur Behandlung von ALI, die 2011 in *Critical care medicine* von Stapleton *et al.* veröffentlicht wurde, wurden beatmungspflichtige Patienten mit ALI eingeschlossen. Randomisiert haben 41 Patienten Fischöl mit 9,75 g EPA und 6,75 g DHA täglich für 14 Tage enteral zugeführt bekommen. 49 Patienten haben ein salzhaltiges Placebo erhalten. Durch die Gabe von Fischöl ist die EPA-Serumkonzentration signifikant

angestiegen. Dennoch gab es keine signifikanten Unterschiede in den gemessenen IL-6 und IL-8 Konzentrationen in der Bronchoalveolären Lavage sowie im Plasma zwischen beiden Behandlungsarmen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede bei Organversagen, beatmungs- und intensivstationsfreien Tagen sowie der Mortalität gefunden werden (68).

In einer Recherchearbeit von *Hooper et al.* über die Risiken und Nutzen von  $\omega$ -3-FS auf Mortalität, kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs wurden randomisierte kontrollierte Studien mit einer  $\omega$ -3-FS Einnahme von  $\geq 6$  Monaten bei Probanden mit und ohne Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen analysiert. Die Ergebnisse der untersuchten Studien waren widersprüchlich, sodass *Hooper et al.* schlussfolgern, dass  $\omega$ -3-FS keinen eindeutigen Effekt auf die Gesamtmortalität, kombinierte kardiovaskuläre Ereignisse oder Krebs haben (69).

Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) hat im Mai 2009 eine Stellungnahme zu  $\omega$ -3-FS verfasst. Darin werden Risikopotenziale von EPA und DHA bei übermäßigem Verzehr beschrieben. Der LDL-Cholesterinspiegel kann sich ab 0,7 g DHA/EPA pro Tag erhöhen, die Immunabwehr bei älteren Menschen kann beeinträchtigt werden, es gibt Hinweise auf eine mögliche Erhöhung der kardiovaskulären Mortalität bei Menschen mit kardiovaskulären Erkrankungen bei Langzeitanwendung und außerdem gibt es Hinweise auf eine erhöhte Blutungsneigung ab 1,5 g DHA/EPA pro Tag (70).

#### **4.4 Ergebnisse: Beeinflussung der wnt5a-Expression durch präoperative Immunonutrition**

In der Studiengruppe, die die  $\omega$ -3-FS-reiche Trinknahrung eingenommen hat, ist die Expression von wnt5a und NF- $\kappa$ B nach den zwei Wochen der Einnahme leicht gesunken ( $p > 0,05$ ).

Die wnt5a Expression ist in der anderen Studiengruppe ohne  $\omega$ -3-FS leicht gestiegen ( $p > 0,05$ ), die NF- $\kappa$ B Expression dagegen auch leicht gesunken ( $p > 0,05$ ).

Somit konnte weder mit dem Supportan®DRINK, noch mit dem Fresubin® Protein Energy ein spezifischer Effekt auf die pro-inflammatorischen Moleküle wnt5a und NF-κB nachgewiesen werden.

Genauso konnten in der zitierten *OMEGA-Studie* und einer weiteren randomisierten placebokontrollierten Phase II Studie über ω-3-FS zur Behandlung von ALI keine Reduktion von inflammatorischen Biomarkern wie IL-6 und IL-8 im Serum gefunden werden.

Es lässt sich lediglich eine Tendenz in der Gruppe mit ω-3-FS erkennen, bei der die wnt5a- und NF-κB-Level sinken. Diese Tendenz muss in Studien mit größeren Fallzahlen überprüft werden.

Generell ist es problematisch, einzelne Studien zum Thema ω-3-FS miteinander zu vergleichen. Die Probanden erhalten ω-3-FS in jeder Studie in verschiedenen Darreichungsformen (z.B. Fischöl oder Fischölkapseln), sowie in verschiedenen Dosierungen und über unterschiedlich lange Zeiträume.

Die Wirkung und die Wirkmechanismen von ω-3-FS werden zwar schon seit langem untersucht, dennoch besteht in diesen Bereichen weiterhin Forschungsbedarf, da immer wieder widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht werden. Es ist noch nicht ausreichend geklärt, bei wem bzw. bei welchen Erkrankungen ω-3-FS gesundheitsfördernde oder gesundheitsschädliche Einflüsse haben und in welcher Menge man ω-3-FS bei Langzeitanwendung zu sich nehmen sollte.

#### **4.5 Lebensqualität und Krebsdiagnose**

„Lebensqualität ist die subjektive Wahrnehmung einer Person über ihre Stellung im Leben in Relation zur Kultur und den Wertsystemen, in denen sie lebt und in Bezug auf ihre Ziele, Erwartungen, Standards und Anliegen.“ (WHO 1993).

Für die meisten Menschen zählen das körperliche Befinden, eine seelische Stabilität, Selbständigkeit im Alltag, ein sicheres Umfeld, der Glauben und der Sinn des Lebens auch zur Lebensqualität (71).

Durch eine Krebsdiagnose kann es zu einer starken Einschränkung der Lebensqualität kommen. Faktoren, die dazu führen können, sind zum einen die Diagnosestellung an sich, zum anderen belastende Therapien mit Nebenwirkungen, einer Einschränkung im Alltag und im sozialen Umgang, Rückfälle, Ängste und Depressionen. Viele

Patienten kommen im Verlauf der Erkrankung allerdings auch gut mit der Situation zurecht. Man spricht vom sogenannten „Zufriedenheitsparadoxon“. Sie haben trotz der Situation eine hohe Lebensqualität und stellen Dinge, die trotz der Erkrankung möglich sind eher in den Vordergrund als die Dinge, die nicht mehr möglich sind. Außerdem wird vielen Erkrankten bewusst, was ihnen wirklich wichtig ist im Leben (71).

In der Onkologie kann die Lebensqualität durch verschiedene Fragebögen oder Indices gemessen werden. Diese Messungen sind, genauso wie die Lebensqualität an sich, subjektiv.

Häufig verwendet werden beispielsweise der Karnofsky-Index, der den körperlichen Zustand und das Allgemeinbefinden misst, das *Sickness Impact Profile* (SIP), das den Zustand des Patienten anhand von Alltagsaktivitäten bewertet und der *EORTC-QLC*, der speziell für Tumorpatienten ausgerichtet ist (71). In dieser Studie wurde der SF-12, ein standardisierter und krankheitsunspezifischer Fragebogen zur Erfassung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität, verwendet.

Um die Lebensqualität zu verbessern, können Patienten und Angehörige eine psychoonkologische Betreuung in Anspruch nehmen, die es in fast jeder Klinik gibt. Außerdem gibt es Krebsberatungsstellen und Selbsthilfegruppen, bei denen sich Patienten Hilfe holen können. Zudem ist es wichtig, Nebenwirkungen bei den Therapien zu vermeiden beziehungsweise gut zu behandeln (71). So ist eine weitestgehende Schmerz- und Beschwerdefreiheit ein wichtiger Faktor, um die Lebensqualität zu verbessern. Die Lebensqualität kann auch durch Sport, durch Entspannungsübungen wie progressive Muskelentspannung, durch gesunde Ernährung oder künstlerische Tätigkeiten verbessert werden. Entspannungsübungen können auch auf die Schlafqualität positive Einflüsse haben. Wichtig für die Patienten ist das Gefühl, selbst etwas für ihr Wohlbefinden tun zu können (72).

Durch eine präoperative Verbesserung der Ernährungssituation können Patienten etwas für die Verbesserung ihrer Lebensqualität tun, indem sie selbst etwas dazu beitragen und beispielsweise eine Trinknahrung zur Operationsvorbereitung einnehmen.

#### 4.6 Ergebnisse: Beeinflussung der Lebensqualität durch die Einnahme der Trinknahrungen

Die Summen der Körperlichen Summenskala blieben in beiden Gruppen unverändert. Auch die Summe der Psychischen Summenskala hat sich in der Gruppe mit  $\omega$ -3-FS nicht verändert. In der Gruppe ohne  $\omega$ -3-FS ist die Summe der PSK dagegen signifikant angestiegen ( $p = 0,046$ ).

Die Ergebnisse der SF-12 Auswertung zeigen keine spezifischen Effekte der präoperativen Einnahme von Trinknahrungen auf die KSK und die PSK.

Dennoch wurde von allen Patienten berichtet, dass die Einnahme der Trinknahrung ihnen „gut getan“ habe und so der Aspekt des „selbst etwas für das eigene Wohlbefinden tun“ eine große, aber nicht im SF-12 messbare Rolle spielt.

#### 4.7 Wnt5a und andere Karzinome

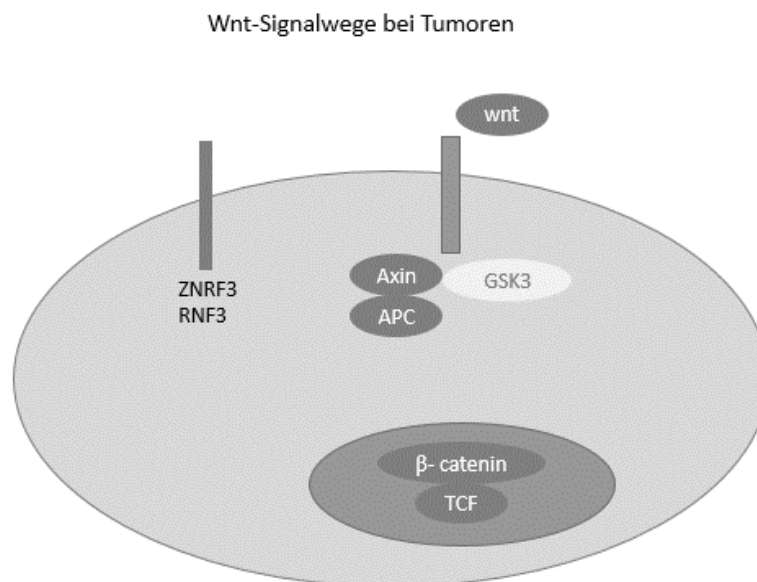
Wnt5a spielt nicht nur bei der Tumorprogression von urologischen und gastrointestinalen Tumoren eine Rolle, sondern auch bei diversen anderen Tumorentitäten.

In Melanomen korreliert eine hohe wnt5a Expression mit der Tumoraggressivität (73,74), der Tumorprogression und einem schlechteren *Outcome* (74,75). Über den wnt5a/ $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg aktiviert wnt5a die Freisetzung von IL-6, IL-8 und den proangiogenen Faktoren *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) und Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2) (76).

In aggressiven, wenig differenzierten Ovarialkarzinomläsionen ist der wnt5a-Rezeptor *Receptor kinase like orphan receptor 1* (ROR1) hochreguliert und korreliert mit einer schlechten Prognose (77). Außerdem wurde eine direkte Korrelation zwischen der Aldehyd-Dehydrogenase 1 (ALDH1), einem Marker für ovarielle Tumorstammzellen, und der ROR1 Expression gefunden (78).

In Nasopharynxkarzinomzellen fördert wnt5a stammzellähnliche Eigenschaften, die zur Tumorgenese und zu Metastasierungen führen (79).

Dagegen wirkt wnt5a im Mammakarzinom als Tumorsuppressor. Wnt5a und der *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), der tumorsuppressive Effekte hat, inhibieren zusammen den kanonischen Signalweg (80). Außerdem kann wnt5a über den *Related to receptor tyrosine kinase receptor* (Ryk Rezeptor) von *Tumor initiating cells* (TICs) wirken. Nachdem wnt5a an den Ryk Rezeptor gebunden hat, bildet es einen Komplex mit dem TGF- $\beta$  Rezeptor 1. Daraufhin wird ein Signalprotein phosphoryliert und aktiviert, wodurch das Basalzell- und Tumorzellwachstum gehemmt wird (81). In dem Tumorgewebe von Mammakarzinom Patientinnen konnte auch eine starke Korrelation zwischen der wnt5a Expression in malignen Epithelzellen und der Frequenz von CD163<sup>+</sup> anti-inflammatorischen tumorassoziierten Makrophagen gefunden werden (82).



**Abbildung 21: wnt5a Signalwege in humanen Tumoren oder Tumormodellen.**

*Die dunkelgrau markierten Bestandteile des wnt-Signalweges konnten in humanen Tumoren oder Tumormodellen nachgewiesen werden (modifizierte Abbildung, 25).*

Wnt ist ein aktiviertes Onkogen und konnte in Mammakarzinomen bei Mäusen gefunden werden (s. Abb 21). APC ist ein bekanntes Tumorsuppressor Gen. Durch Mutationen im APC Gen kann ein Colonkarzinom entstehen und auch Mutationen im  $\beta$ -catenin Gen konnten in Colonkarzinomzellen und in Melanomzellen gefunden werden. AXIN1 Gen Mutationen dagegen wurden in hepatozellulären Karzinomzellen

entdeckt und Mutationen im TCF1 Gen, das als Tumorsuppressorgen fungiert, wurden in Karzinomzellen der Mamma und des Darms entdeckt (25).

#### 4.8 Limitationen der Studie

Alle Versuche und Berechnungen sind standardisiert abgelaufen, um Fehlerquellen zu minimieren.

In der Studienpopulation liegt nur eine Fallzahl von  $n = 18$  vor. Durch die niedrige Fallzahl wurde angenommen, dass die Daten nicht normalverteilt sind, sodass der Median und die 25. und 75. Perzentile berechnet wurden. In der FoCus-Teilpopulation lag eine Fallzahl von  $n = 466$  vor. Auch hier waren die Daten nicht normalverteilt. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde für zwei verbundene Stichproben der Wilcoxon-Test und für zwei unabhängige Stichproben der Mann-Whitney-U Test angewendet. Der Wilcoxon-Test ist das nicht-parametrische Äquivalent zum t-Test für abhängige Stichproben, die Daten müssen im Gegensatz zum t-Test nicht normalverteilt sein, sodass der Wilcoxon-Test auch bei kleineren Stichproben und Ausreißern angewandt werden kann. Der Mann-Whitney-U Test, auch Wilcoxon-Rangsummen-Test genannt, wird angewendet, wenn die Voraussetzungen für einen t-Test für zwei unabhängige Stichproben nicht gegeben sind. Genauso wie der Wilcoxon-Test kann der Mann-Whitney-U Test auch bei kleineren Stichproben und Ausreißern verwendet werden. Um den Zusammenhang zwischen zwei nicht parametrischen Variablen zu berechnen, wurde der Spearman-Korrelationskoeffizient verwendet.

In der Studie wurde bestimmt, wie viel Gramm  $\omega$ -3-FS von jedem Probanden pro Tag aufgenommen wurden. Nicht bestimmt wurde die Konzentration der  $\omega$ -3-FS im Serum. Die Resorption der  $\omega$ -3-FS über den Darm kann individuell variieren, sodass die Konzentrationen von EPA und DHA im Serum geeignete Parameter sind, um die Resorption zu überprüfen und Effekte auf wnt5a zu erklären.

Die Probanden haben die Trinknahrung über zwei Wochen eingenommen. Es gibt keine eindeutigen Daten darüber, ob die zweiwöchige Einnahme von  $\omega$ -3-FS für eine signifikante Reduktion inflammatorischer Marker wie wnt5a ausreichend ist. Außerdem gibt es keine Empfehlung für die Darreichungsform und die richtige Dosierung für einen positiven Effekt auf wnt5a.

#### 4.9 Abschließende Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend konnten weder in der Studie mit der Immunonutrition noch in der FoCus-Kohorte signifikante Zusammenhänge zwischen der oralen Zufuhr der  $\omega$ -3-FS EPA und DHA und der wnt5a Proteinmenge beziehungsweise der wnt5a Serumkonzentration beobachtet werden.

Die Lebensqualität hat sich durch die Einnahme der Trinknahrungen präoperativ subjektiv verbessert. Bei der Auswertung des SF-12 wurde eine signifikante Steigerung der PSK in dem Studienarm ohne  $\omega$ -3-FS beobachtet.

Weitere Studien zum Thema  $\omega$ -3-FS und wnt5a sind notwendig, um den Zusammenhang zu untersuchen und um evaluieren zu können, ob sich die wnt5a Konzentrationen in PBMCs und im Serum durch die orale Zufuhr von  $\omega$ -3-FS beeinflussen lässt.

Auch sind weitere Studien zum Thema  $\omega$ -3-FS im Allgemeinen notwendig. Die bis jetzt durchgeführten Studien zeigen ambivalente Ergebnisse und es muss differenziert untersucht werden, bei welchen Erkrankungen oder bei welchen Individuen  $\omega$ -3-FS einen positiven Einfluss auf die Gesundheit haben können und bei welchen sie keinen oder sogar einen gegenteiligen Effekt haben. Zudem sind weitere Studien notwendig, um herauszufinden in welcher Dosierung und welcher Darreichungsform  $\omega$ -3-FS gegeben werden sollten.



## 5. Zusammenfassung

Omega-3-Fettsäuren ( $\omega$ -3-FS) haben anti-inflammatorische und anti-proliferative Eigenschaften. Diese Effekte können vor allem bei Patienten mit einem Karzinom von großer Bedeutung sein.

Das pro-inflammatorische und pro-proliferative Glykoprotein wnt5a wird unter anderem von Makrophagen sezerniert. In einem *in vitro* Projekt unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Expression von wnt5a durch Fettsäuren reguliert wird. Dabei haben mehrfach ungesättigte Fettsäuren die Expression von wnt5a reduziert.

In der vorliegenden Studie wird dieser Effekt *in vivo* untersucht. Dazu wurde eine monozentrische, prospektive, randomisierte, kontrollierte, humane klinische Studie mit 18 Patienten durchgeführt, die ein urologisches oder gastrointestinales Karzinom haben. Die Patienten haben randomisiert die mit  $\omega$ -3-FS angereicherte Trinknahrung Supportan© oder die Standardtrinknahrung Fresubin© Protein Energy Drink erhalten.

Mit dieser Studie soll untersucht werden, ob  $\omega$ -3-FS der Trinknahrung Supportan© einen anti-inflammatorischen Effekt über eine Beeinflussung der Zytokine wnt5a und NF- $\kappa$ B haben. Dafür wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes isoliert und die wnt5a und NF- $\kappa$ B Expression auf Proteinebene gemessen. Zudem wurde die Körperzusammensetzung mittels Bioelektrischer Impedanzanalyse bestimmt und die Lebensqualität anhand des SF-12 evaluiert.

Die Expression der Zytokine wnt5a und NF- $\kappa$ B ist durch die Einnahme der Trinknahrung mit  $\omega$ -3-FS nicht signifikant gesunken. In der Kontrollgruppe ist die wnt5a Expression nicht signifikant gestiegen und die NF- $\kappa$ B Expression nicht signifikant gesunken.

Somit konnte weder mit dem Supportan®DRINK, noch mit dem Fresubin® Protein Energy ein spezifischer Effekt auf die pro-inflammatorischen Moleküle wnt5a und NF- $\kappa$ B nachgewiesen werden.

Außerdem wurde die Korrelation zwischen der täglichen Zufuhr von  $\omega$ -3-FS und dem wnt5a Serumspiegel bei gesunden Probanden einer FoCus-Teilpopulation (n = 466) sowie der Unterschied zwischen den wnt5a Serumspiegeln bei Probanden mit einer niedrigen  $\omega$ -3-FS Zufuhr ( $\leq 250$  mg/d) und einer hohen  $\omega$ -3-FS Zufuhr ( $> 250$  mg/d) getestet.

Es konnte weder eine signifikante Korrelation zwischen der  $\omega$ -3-FS Zufuhr und dem wnt5a Serumspiegel noch ein signifikanter Unterschied zwischen den wnt5a Serumspiegeln der beiden Gruppen festgestellt werden.

## 6. **Abstract**

Omega-3-fatty acids have anti-inflammatory and anti-proliferative characteristics. Those effects may be of high importance for patients with cancer.

The pro-inflammatory and pro-proliferative glycoprotein wnt5a is secreted by macrophages.

In an *in vitro* project of our working group there was shown that the expression of wnt5a is regulated by fatty acids. Poly-unsaturated fatty acids reduce the expression of wnt5a.

In this study this effect is analysed *in vivo*. Therefore we performed a monocentric, prospective, randomised, controlled, human clinical trial. 18 patients with urological or gastrointestinal cancer were included. They got the nutrition drink Supportan© which is nourished with omega-3-fatty acids or the standard nutrition drink Fresubin© Protein Energy Drink randomised.

In this study we examine if omega-3-fatty acids of the nutrition drink Supportan© have positive and anti-inflammatory effects on the cytokines wnt5a and NF-κB.

Mononuclear cells of the peripheral blood were isolated and wnt5a and NF-κB protein levels were quantified.

The body composition was measured by bioelectric impedance analysis and the quality of life by the SF-12.

The expression of wnt5a and NF-κB is not decreased significantly by the nutrition drink nourished with omega-3-fatty acids. In the control group the expression of wnt5a increased not significantly and the expression of NF-κB decreased not significantly.

Consequently it could not be shown a specific effect on pro-inflammatory wnt5a and NF-κB neither with Supportan©DRINK nor with Fresubin© Protein Energy Drink.

Furthermore we examined the correlation between the omega-3-fatty acids intake and the wnt5a serum level in a FoCus-subpopulation (n = 466) and we compared the wnt5a serum level between test persons with a low ( $\leq 250$  mg/d) daily intake of omega-3-fatty acids and a high ( $> 250$  mg/d) daily intake of omega-3-fatty acids.

It could neither be shown a significant correlation between the omega-3-fatty acids intake and the wnt5a serum level nor a significant difference between the wnt5a serum levels of the group with the low intake and the group with the high intake of omega-3-fatty acids.

## 7. Literaturverzeichnis

1. dkfz. Deutsches Krebsforschungszentrum. Krebsentstehung: Wie aus gesunden Zellen Tumorzellen werden [Online im Internet:]URL: <https://www.krebsinformationsdienst.de/grundlagen/krebsentstehung.php#inhalt17>, [Stand: 07.09.2017, 09:02 Uhr].
2. Artemis P Simopoulos. Essential fatty acids in health and chronic disease. The American Journal of Clinical Nutrition. 1999;70:560S-9S.
3. Blumenthal A, Ehlers S, Lauber J, Buer J, Lange C, Goldmann T, Heine H, Brandt E, Reiling N. The Wingless homolog WNT5A and its receptor Frizzled-5 regulate inflammatory responses of human mononuclear cells induced by microbial stimulation. Blood. 2006;108(3):965–73. doi:10.1182/blood-2005-12-5046
4. Talukdar S, Olefsky JM, Osborn O. Targeting GPR120 and other fatty acid-sensing GPCRs ameliorates insulin resistance and inflammatory diseases. Trends Pharmacol Sci. 2011;32(9):543–50. doi:10.1016/j.tips.2011.04.004
5. Schulte DM. Entzündung und Stoffwechsel: Molekulare Erklärung für schädliches Übergewicht [Online im Internet:]URL: <http://inflammation-at-interfaces.de/de/newsroom/jahresberichte/2014/entzuendung-und-stoffwechsel> [Stand: 17.06.2017]. 2014.
6. Gökhan S. Hotamisligil. Inflammation and metabolic disorders. Nature [Internet]. 2006;(444):860–7. Available from: doi:10.1038/nature05485
7. Eberhard Standl. Was ist ein Metabolisches Syndrom?: <https://www.internisten-im-netz.de/krankheiten/metabolisches-syndrom/was-ist-ein-metabolisches-syndrom/> Zuletzt geprüft am 5. November 2017, 10 Uhr. 2017.
8. Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, DocCheck Flexikon: [Online im Internet:]URL: [http://flexikon.doccheck.com/de/Mononukle%C3%A4re\\_Zellen\\_des\\_peripheren\\_Blutes](http://flexikon.doccheck.com/de/Mononukle%C3%A4re_Zellen_des_peripheren_Blutes), [Stand: 19.11.2017, 16.50 Uhr].
9. Herbert Renz-Polster, Steffen Krautzig, editors. Basislehrbuch Innere Medizin. 5th ed. München: Urban & Fischer; 2013, S. 249-256.
10. Stefan H.E. Kaufmann, editor. Basiswissen Immunologie. 7th ed. Berlin: Springer; 2012.
11. Granulozyt, DocCheck Flexikon: [Online im Internet:]URL: <http://flexikon.doccheck.com/de/Granulozyt>, [Stand: 28.04.2017, 09.10 Uhr].

12. Makrophage, DocCheck Flexikon: [Online im Internet:] URL:  
<http://flexikon.doccheck.com/de/Makrophage>, [Stand: 18.11.2017, 17.17 Uhr].
13. Lymphozyt, DocCheck Flexikon: [Online im Internet:]URL:  
<http://flexikon.doccheck.com/de/Lymphozyt>, [Stand: 19.11.2017, 16.45 Uhr].
14. Roland Geisberger. Tumorimmunologie. Spectrum Onkologie. 2017;(04/2017):86–7.
15. Einführung in die Tumorimmunologie, MSD Manual: [Online im Internet:]URL:  
<http://www.msdmanuals.com/de-de/profi/h%C3%A4matologie-und-onkologie/tumorimmunologie/tumorantigene>, [Stand: 17.06.2017, 16:11 Uhr].
16. Magenkarzinom, Amboss Miamed: [Online im Internat:]URL:  
<https://amboss.miamed.de/library#xid=-g0DB2&term=Magenkarzinom>, [Stand: 16.09.2017, 13.30 Uhr].
17. Roel Nusse, Harold E. Varmus. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*. 1982;Volume 31, Issue 1,99–109.
18. Nüsslein-Volhard C., Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 1980 Oct30;(287(5785)):795–801.
19. Roel Nusse et al. A New Nomenclature for int-1 and Related Genes: The wnt Gene Family. *Cell*. 1991 Jan;Vol. 64:231–2.
20. Laudes M. Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. *J Mol Endocrinol*. 2011;46(2):R65-R72. doi:10.1530/JME-10-0169
21. van Amerongen R, Nusse R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*. 2009;136(19):3205–14. doi:10.1242/dev.033910
22. Bhatt PM, Malgor R. Wnt5a: A player in the pathogenesis of atherosclerosis and other inflammatory disorders. *Atherosclerosis*. 2014;237(1):155–62. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.08.027
23. Torres MA, Yang-Snyder JA, Purcell SM, DeMarais AA, McGrew LL, Moon RT. Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J Cell Biol*. 1996 Jun;133(5):1123–37.
24. Bauer M, Benard J, Gaasterland T, Willert K, Cappellen D. WNT5A encodes two isoforms with distinct functions in cancers. *PLoS One*. 2013;8(11):e80526. doi:10.1371/journal.pone.0080526

25. Roel Nusse. The Wnt homepage: [Online im Internet:]URL: <http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/cancer>, [Stand: 13.12.2016, 17:37 Uhr].
26. Lee GT, Kang DI, Ha Y-S, Jung YS, Chung J, Min K, Kim TH, Moon KH, Chung JM, Lee DH, Kim W-J, Kim IY. Prostate cancer bone metastases acquire resistance to androgen deprivation via WNT5A-mediated BMP-6 induction. *Br J Cancer*. 2014;110(6):1634–44. doi:10.1038/bjc.2014.23
27. Jin F, Qu X, Fan Q, Wang L, Tang T, Hao Y, Dai K. Regulation of prostate cancer cell migration toward bone marrow stromal cell-conditioned medium by Wnt5a signaling. *Mol. Med. Rep.* 2013;(8):1486–92.
28. Ara H, Takagishi M, Enomoto A, Asai M, Ushida K, Asai N, Shimoyama Y, Kaibuchi K, Kodera Y, Takahashi M. Role for Daple in non-canonical Wnt signaling during gastric cancer invasion and metastasis. *Cancer Sci.* 2016;107(2):133–9. doi:10.1111/cas.12848
29. Li S, Wang W, Zhang N, Ma T, Zhao C. IL-1 beta mediates MCP-1 induction by Wnt5a in gastric cancer cells. *BMC Cancer*. 2014;14:4801–9. doi:10.1186/1471-2407-14-480
30. Bo H, Zhang S, Gao L, Chen Y, Zhang J, Chang X, Zhu M. Upregulation of Wnt5a promotes epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of pancreatic cancer cells. *BMC Cancer*. 2013;13496. doi:10.1186/1471-2407-13-496
31. Bo H, Gao L, Chen Y, Zhang J, Zhu M. Upregulation of the expression of Wnt5a promotes the proliferation of pancreatic cancer cells in vitro and in a nude mouse model. *Mol Med Rep.* 2016;13(2):1163–71. doi:10.3892/mmr.2015.4642
32. Asem MS, Buechler S, Wates RB, Miller DL, Stack MS. Wnt5a signaling in cancer. *Cancers (Basel)*. 2016;8(9):79–97. doi:10.3390/cancers8090079
33. Burr GO, Burr MM. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *J. Biol. Chem.* 1929;82,345–67.
34. Burr GO, Burr MM. On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition. *J. Biol. Chem.* 1930;86587–621.
35. Smith W, Mukhopadhyay R. Essential fatty acids: The work of George and Mildred Burr. *J Biol Chem [Internet]*. 2012;287(42):35439–41. Available from: DOI 10.1074/jbc.O112.000005
36. H. O. Bang, J. Dyerberg. Plasma Lipid and Lipoprotein Pattern in Greendlandic West-Coast Eskimos. *The Lancet*. 1971;(June 5):1143–5.

37. Strukturformel DHA, metax.org, [Online im Internet:]URL:  
[https://www.metax.org/Portals/0/Products1/plusDHA/2000px-DHA\\_numbers\\_svg.gif](https://www.metax.org/Portals/0/Products1/plusDHA/2000px-DHA_numbers_svg.gif),  
 [Stand: 18.11.2017, 14.30 Uhr].
38. Omega-3-Fettsäure, chemie.de: [Online im Internet:]URL:  
[http://www.chemie.de/lexikon/Omega-3-Fetts%C3%A4ure.html#\\_note-2/](http://www.chemie.de/lexikon/Omega-3-Fetts%C3%A4ure.html#_note-2/), [Stand:  
 07.01.2017, 16:38 Uhr].
39. Chapkin RS, Kim W, Lupton JR, McMurray DN. Dietary docosaehaenoic and eicosapentaenoic acid: emerging mediators of inflammation. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2009;81(2-3):187–91. doi:10.1016/j.plefa.2009.05.010
40. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM, Olefsky JM. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. Cell. 2010;142(5):687–98. doi:10.1016/j.cell.2010.07.041
41. Fresubin® Protein Energy DRINK [Online im Internet:]URL:  
[https://trinknahrung.shop/pub/media/import/pdf/pi\\_28426.pdf](https://trinknahrung.shop/pub/media/import/pdf/pi_28426.pdf) [Stand: 06.08.2018, 20:01 Uhr] [Internet].
42. Supportan® DRINK [Online im Internet:]URL:  
[https://trinknahrung.shop/pub/media/import/pdf/pi\\_24244.pdf](https://trinknahrung.shop/pub/media/import/pdf/pi_24244.pdf) [Stand: 06.08.2018, 19:58 Uhr] [Internet].
43. GE Healthcare. Ficoll-Paque PLUS: Intended Use, Instructions 71-7167-00 AG;9.
44. SDS-PAGE, chemie.de: [Online im Internet:]URL: <http://www.chemie.de/lexikon/SDS-PAGE.html>, [Stand: 05.01.2017, 07:42 Uhr].
45. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, spektrum.de: [Online im Internet:]URL:  
<http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/sds-polyacrylamid-gelelektrophorese/60509>,  
 [Stand: 05.01.2017, 07:54 Uhr].
46. Western Blot, Chemie.de: [Online im Internet:]URL:  
[http://www.chemie.de/lexikon/Western\\_Blot.html](http://www.chemie.de/lexikon/Western_Blot.html), [Stand: 19.11.2017, 17.35 Uhr].
47. Data Input. Gebrauchsanleitung Nutriguard MS: [Online im Internet:]URL:  
[http://www.data-input.de/media/pdf\\_deutsch\\_2014/data-input-gebrauchsanleitung-nutriguard-ms.pdf](http://www.data-input.de/media/pdf_deutsch_2014/data-input-gebrauchsanleitung-nutriguard-ms.pdf) [Stand: 06.08.2018, 15.31 Uhr]. 2014.
48. SF-12 Kurzversion des SF-36, mlbk.de: [Online im Internet:]URL:  
<http://www.mlbk.de/web/html/quellen/sf-12.html>, [Stand: 10.12.2016, 9:38 Uhr].
49. Schreckenber D, Meis M. Gutachten - Belästigung durch Fluglärm im Umkreis des Frankfurter Flughafens: RDF Fluglärmbelästigungsstudie , Endbericht, AG Fluglärmwirkung. 2006;148.

50. Bullinger M, Kirchberger I. SF-36 Fragebogen zum Gesundheitszustand. Manual. Göttingen: Hogrefe. 1998;66.
51. ELISA, spektrum.de: [Online im Internet:]URL: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/elisa/20874>; [Stand: 18.07.2018, 19.40 Uhr] [Internet].
52. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas M-I, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventos RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez JA, Martínez-González MA. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *N Engl J Med*. 2013;368(14):1279–90. doi:10.1056/NEJMoa1200303
53. A. Weimann, S. Breitenstein, J. P. Breuer, S. E. Gabor, S. Holland-Cunz, M. Kemen, F. Längle, N. Rayes, B. Reith, P. Rittler, W. Schwenk, M. Senkal, DGEM Steering Committee. S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Ernährungsmedizin (DGEM) in Zusammenarbeit mit der GESKES, der AKE, der DGCH, der DGAI und der DGAV: Klinische Ernährung in der Chirurgie. *Aktuel Ernährungsmed* [Internet]. 2013 [cited 2018 Jun 12];38:e155-e197. Available from: [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/073-005l\\_S3\\_Klinische\\_Ern%C3%A4hrung\\_Chirurgie\\_Transplantationen\\_2014-02.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/073-005l_S3_Klinische_Ern%C3%A4hrung_Chirurgie_Transplantationen_2014-02.pdf)
54. Smedley F, Bowling T, James M, Stokes E, Goodger C, O'Connor O, Oldale C, Jones P, Silk D. Randomized clinical trial of the effects of preoperative and postoperative oral nutritional supplements on clinical course and cost of care. *Br J Surg*. 2004 Aug;91(8):983–90.
55. Braga M, Gianotti L, Vignali A, Carlo VD. Preoperative oral arginine and n-3 fatty acid supplementation improves the immunometabolic host response and outcome after colorectal resection for cancer. *Surgery*. 2002 Nov;132(5):805–14.
56. Breitenstein S. Perioperative Immunonutrition in der Bauchchirurgie. *Schweizer Zeitschrift für Ernährungsmedizin*. 2012;(4):12–7.
57. Prof. Dr. Mathias Plauth. Immunonutrition - Grundlagen. *Der kleine LiteRatgeber zur Ernährungsmedizin*;(S. 387-393).
58. Yamin Zheng, Fei Li, Baoju Qi, Bin Luo, Haichen Sun, Shuang Liu, Xiaoting Wu. Application of perioperative immunonutrition for gastrointestinal surgery: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2007;16:253–7.
59. Gianotti L, Braga M, Nespoli L, Radaelli G, Beneduce A, Di Carlo V. A randomized controlled trial of preoperative oral supplementation with a specialized diet in patients

- with gastrointestinal cancer. *Gastroenterology*. 2002;122(7):1763–70.  
doi:10.1053/gast.2002.33587
60. Weimann A, Braga M, Harsanyi L, Laviano A, Ljungqvist O, Soeters P, Jauch KW, Kemen M, Hiesmayr JM, Horbach T, Kuse ER, Vestweber KH. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Surgery including organ transplantation. *Clin Nutr*. 2006;25(2):224–44. doi:10.1016/j.clnu.2006.01.015
  61. Braga M, Gianotti L, Nespoli L, Radaelli G, Di Carlo V. Nutritional approach in malnourished surgical patients: a prospective randomized study. *Arch Surg*. 2002, Feb.;137(2):174–80.
  62. Braga M, Gianotti L, Cestari A, Vignali A, Pellegatta F, Dolci A, Di Carlo V. Gut function and immune and inflammatory responses in patients perioperatively fed with supplemented enteral formulas. *Arch Surg*. 1996 Dec;131(12):1257-64; discussion 1264-5.
  63. Braga M, Gianotti L, Radaelli G, Vignali A, Mari G, Gentilini O, Di Carlo V. Perioperative immunonutrition in patients undergoing cancer surgery: results of a randomized double-blind phase 3 trial. *Arch Surg*. 1999 Apr;134(4):428-33.
  64. B.I.A. Bioelektrische Impedanzanalyse, charite.de: [Online im Internet:]URL: [https://med-poli.charite.de/leistungen/diagnostik/bia\\_bioelektrische\\_impedanz\\_analyse/](https://med-poli.charite.de/leistungen/diagnostik/bia_bioelektrische_impedanz_analyse/) [Stand: 06.08.2018, 15:25 Uhr].
  65. Bioelektrische Impedanzanalyse, pluspatient.de: [Online im Internet:]URL: <http://www.pluspatient.de/patienten-lexikon/bioelektrische-impedanzanalyse-bia-messung>, [Stand: 09.03.2017, 12:05 Uhr].
  66. Martin JM, Stapleton RD. Omega-3 fatty acids in critical illness. *Nutr Rev*. 2010;68(9):531–41. doi:10.1111/j.1753-4887.2010.00313.x
  67. Schott CK, Huang DT. Omega-3 fatty acids, gamma-linolenic acid, and antioxidants: immunomodulators or inert dietary supplements? *Critical care (London)*. 2012;16(6):325. doi:10.1186/cc11863
  68. Stapleton RD, Martin TR, Weiss NS, Crowley JJ, Gundel SJ, Nathens AB, Akhtar SR, Ruzinski JT, Caldwell E, Curtis JR, Heyland DK, Watkins TR, Parsons PE, Martin JM, Wurfel MM, Hallstrand TS, Sims KA, Neff MJ. A phase II randomized placebo-controlled trial of omega-3 fatty acids for the treatment of acute lung injury. *Crit Care Med*. 2011;39(7):1655–62. doi:10.1097/CCM.0b013e318218669d
  69. Hooper L, Thompson RL, Harrison RA, Summerbell CD, Ness AR, Moore HJ, Worthington HV, Durrington PN, Higgins JPT, Capps NE, Riemersma RA, Ebrahim SBJ, Davey Smith G. Risks and benefits of omega 3 fats for mortality, cardiovascular



- disease, and cancer: systematic review. *BMJ*. 2006;332(7544):752–60.  
doi:10.1136/bmj.38755.366331.2F
70. Für die Anreicherung von Lebensmitteln mit Omega-3-Fettsäuren empfiehlt das BfR die Festsetzung von Höchstmengen, Stellungnahme Nr. 030/2009 des BfR, 26. Mai 2009, [Online im Internet:] URL:  
[https://www.bfr.bund.de/cm/343/fuer\\_die\\_anreicherung\\_von\\_lebensmitteln\\_mit\\_omega\\_3\\_fettsaeuren\\_empfiehlt\\_das\\_bfr\\_die\\_festsetzung\\_von\\_hoechstmengen.pdf](https://www.bfr.bund.de/cm/343/fuer_die_anreicherung_von_lebensmitteln_mit_omega_3_fettsaeuren_empfiehlt_das_bfr_die_festsetzung_von_hoechstmengen.pdf) [Stand: 06.08.2018].
  71. Krankheitsverarbeitung, Lebensqualität und Krebs, dkfz. Krebsinformationsdienst: [Online im Internet:]URL:  
<https://www.krebsinformationsdienst.de/leben/krankheitsverarbeitung/lebensqualitaet.php>, [Stand: 14.06.2018, 16 Uhr].
  72. Die Lebensqualität bei einer Krebserkrankung verbessern, Onko Internetportal, [Online im Internet:]URL: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/leben-mit-krebs/alltag-mit-krebs/lebensqualitaet.html>, [Stand: 14.06.2018, 17.40 Uhr].
  73. Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, Trent JM. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell*. 2002;1(3):279–88. doi:10.1016/S1535-6108(02)00045-4
  74. O'Connell MP, Fiori JL, Xu M, Carter AD, Frank BP, Camilli TC, French AD, Dissanayake SK, Indig FE, Bernier M, Taub DD, Hewitt SM, Weeraratna AT. The orphan tyrosine kinase receptor, ROR2, mediates Wnt5A signaling in metastatic melanoma. *Oncogene*. 2010;29(1):34–44. doi:10.1038/onc.2009.305
  75. Da Forno PD, Pringle JH, Hutchinson P, Osborn J, Huang Q, Potter L, Hancox RA, Fletcher A, Saldanha GS. WNT5A expression increases during melanoma progression and correlates with outcome. *Clin Cancer Res*. 2008;14(18):5825–32. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-5104
  76. Ekstrom EJ, Bergenfelz C, Bulow V v., Serifler F, Carlemalm E, Jonsson G, Andersson T, Leandersson K. WNT5A induces release of exosomes containing pro-angiogenic and immunosuppressive factors from malignant melanoma cells. *Mol Cancer*. 2014;1388. doi:10.1186/1476-4598-13-88
  77. Zhang H, Qiu J, Ye C, Yang D, Gao L, Su Y, Tang X, Xu N, Zhang D, Xiong L, Mao Y, Li F, Zhu J. ROR1 expression correlated with poor clinical outcome in human ovarian cancer. *Sci Rep*. 2014;41–7. doi:10.1038/srep05811

78. Zhang S, Cui B, Lai H, Liu G, Ghia EM, Widhopf GF2, Zhang Z, Wu CCN, Chen L, Wu R, Schwab R, Carson DA, Kipps TJ. Ovarian cancer stem cells express ROR1, which can be targeted for anti-cancer-stem-cell therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(48):17266–71. doi:10.1073/pnas.1419599111
79. Qin L, Yin YT, Zheng FJ, Peng LX, Yang CF, Bao YN, Liang YY, Li XJ, Xiang YQ, Sun R, et al. Wnt5a promotes stemness characteristics in nasopharyngeal carcinoma cells leading to metastasis and tumorigenesis. *Oncotarget*. 2015;(6):10239–52.
80. Roarty K, Baxley SE, Crowley MR, Frost AR, Serra R. Loss of TGF- $\beta$  or Wnt5a results in an increase in Wnt/ $\beta$ -catenin activity and redirects mammary tumour phenotype. *Breast Cancer Res*. 2009 Apr. 3;11(2).
81. Borcherdig N, Kusner D, Kolb R, Xie Q, Li W, Yuan F, Velez G, Askeland R, Weigel RJ, Zhang W. Paracrine WNT5A signaling inhibits expansion of tumor-initiating cells. *Cancer Res*. 2015;75(10):1972–82. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2761
82. Bergenfelz C, Medrek C, Ekstrom E, Jirstrom K, Janols H, Wullt M, Bredberg A, Leandersson K. Wnt5a induces a tolerogenic phenotype of macrophages in sepsis and breast cancer patients. *J Immunol*. 2012;1885448–58. doi:10.4049/jimmunol.1103378

## 8. Anhang

Original Western Blots zur Detektion von wnt5a, NF- $\kappa$ B und GAPDH.

Für alle Western Blots gilt:

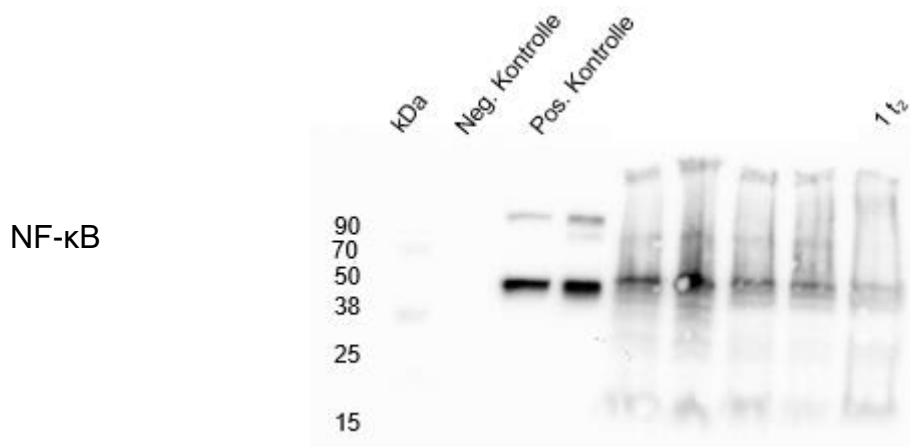
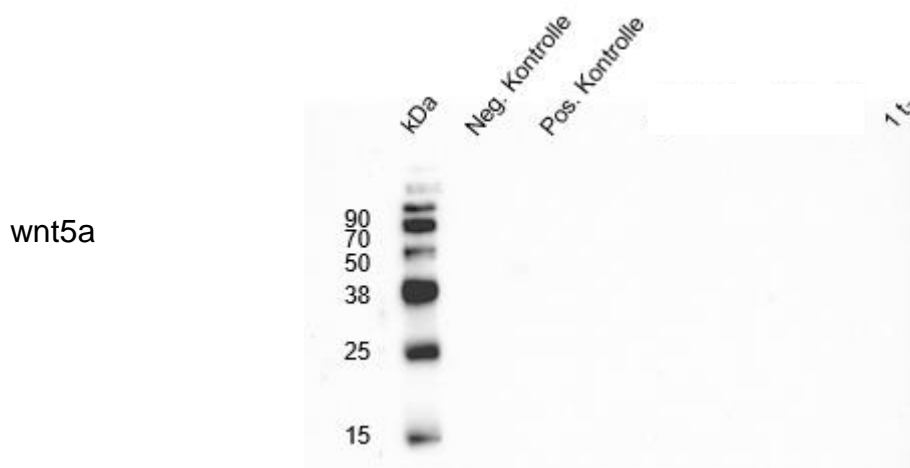
**Spur 1:** 4  $\mu$ l *Western Sure Prestained Chemiluminescent Protein Ladder*

**Spur 2:** 5  $\mu$ l APL als Negativ-Kontrolle

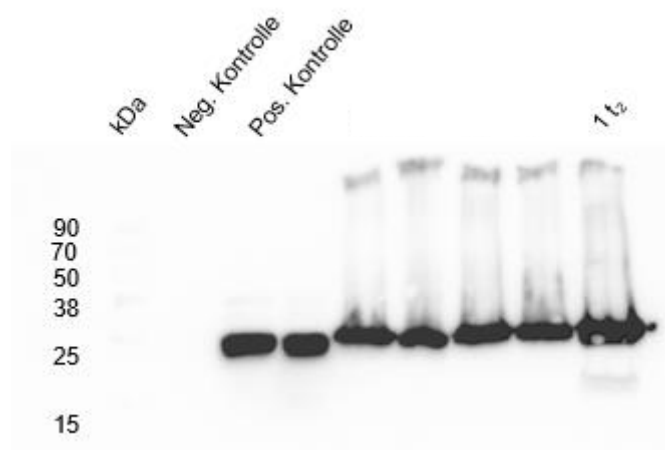
**Spur 3:** 50  $\mu$ g eines Lysats aus differenzierten THP-1 Zellen als Positiv-Kontrolle

**Spur 5-10:** Proben der Probanden zum Zeitpunkt  $t_0$  und  $t_2$

### 1. Western Blots des Probanden 1:

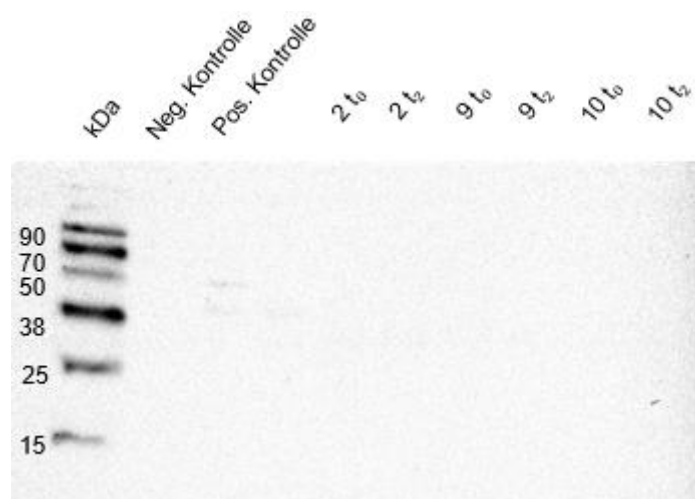


GAPDH

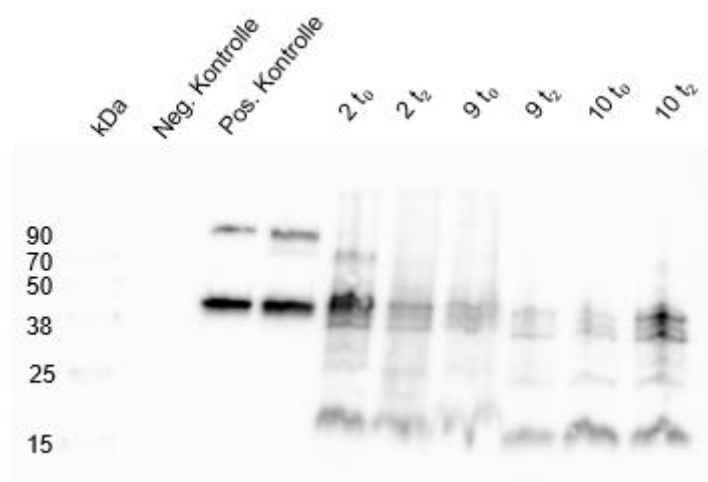


2. Western Blots der Probanden 2, 9 und 10:

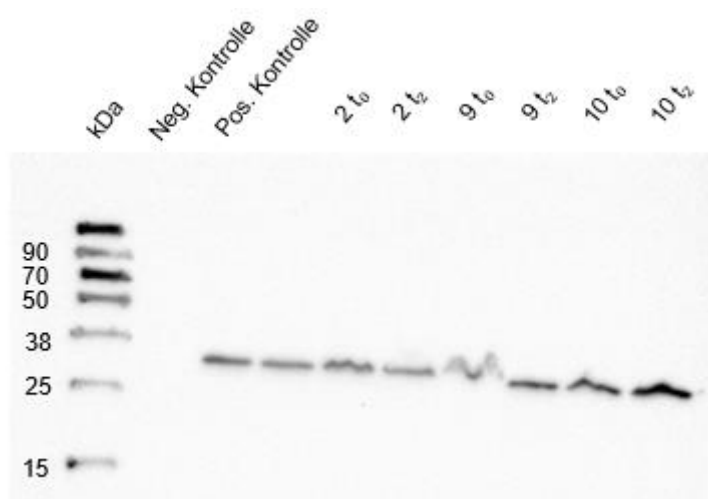
wnt5a



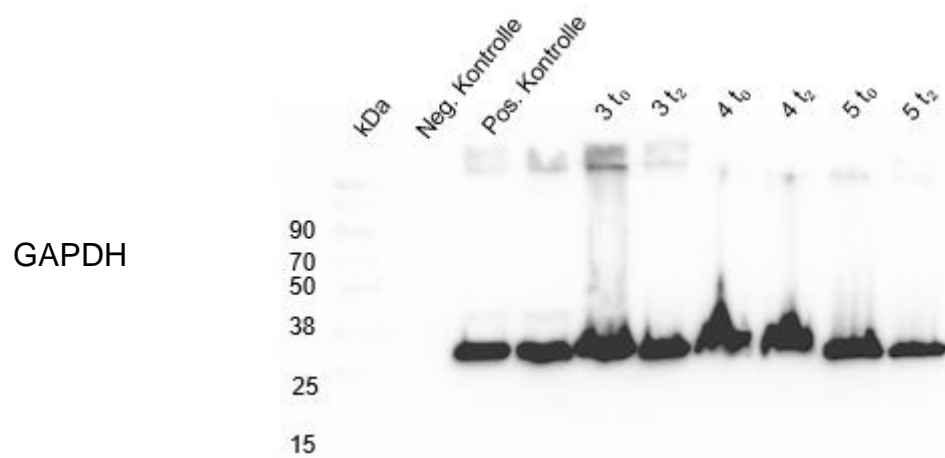
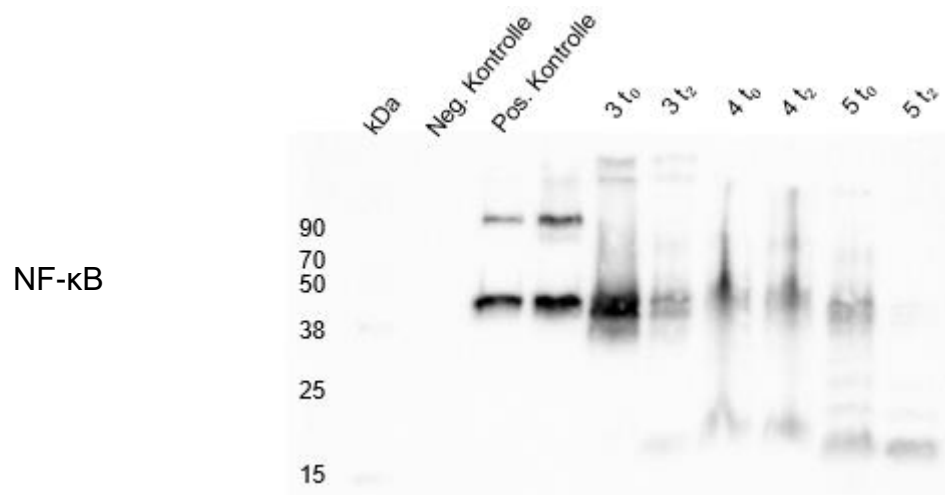
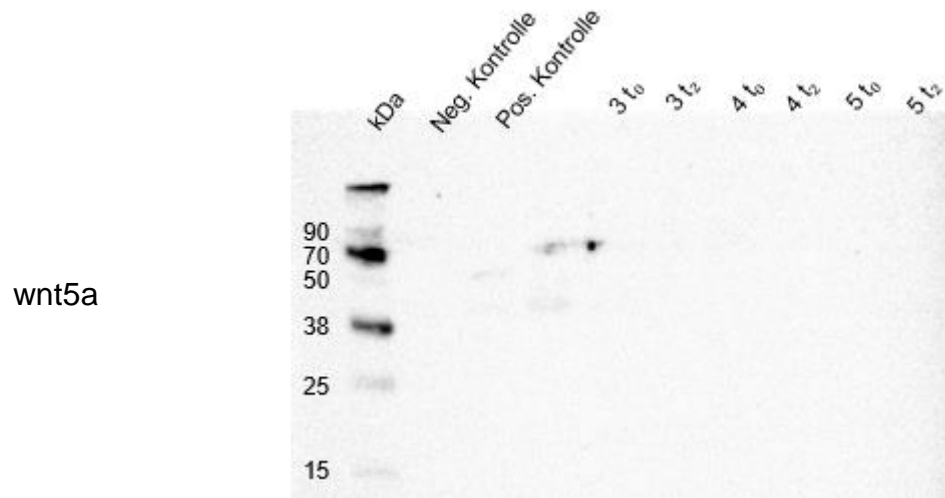
NF- $\kappa$ B



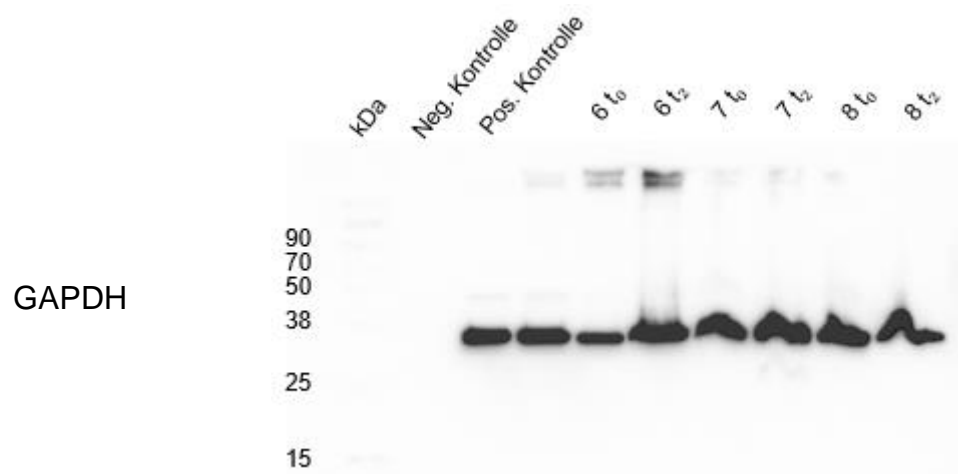
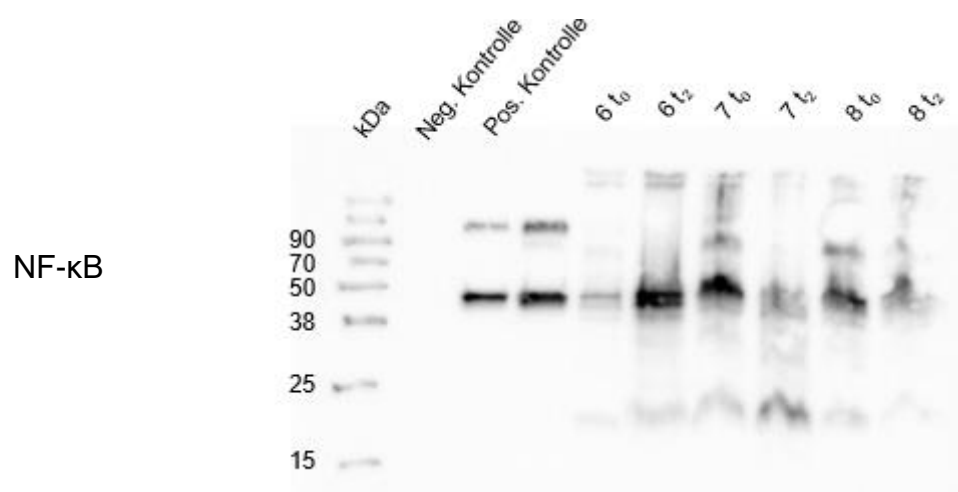
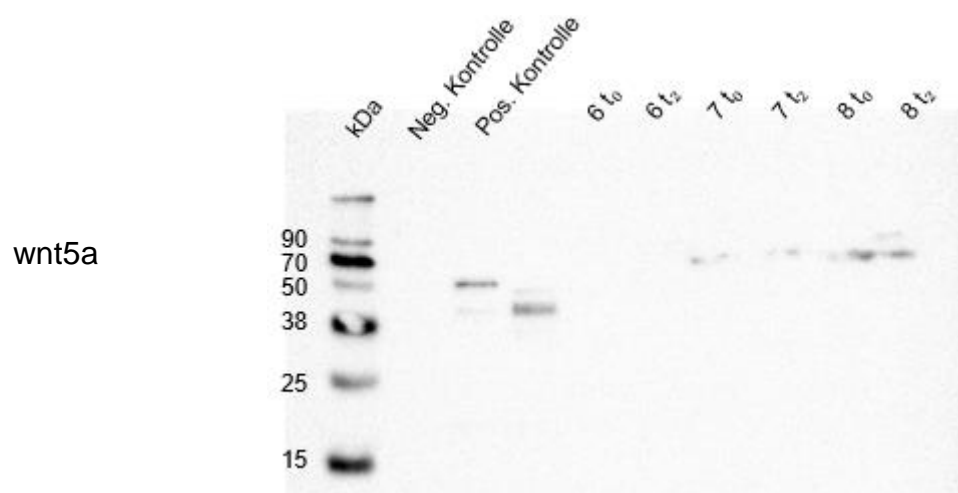
GAPDH



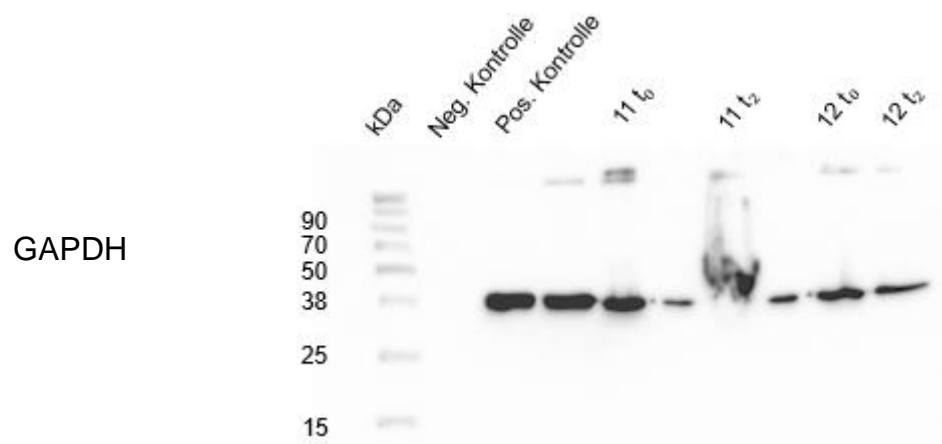
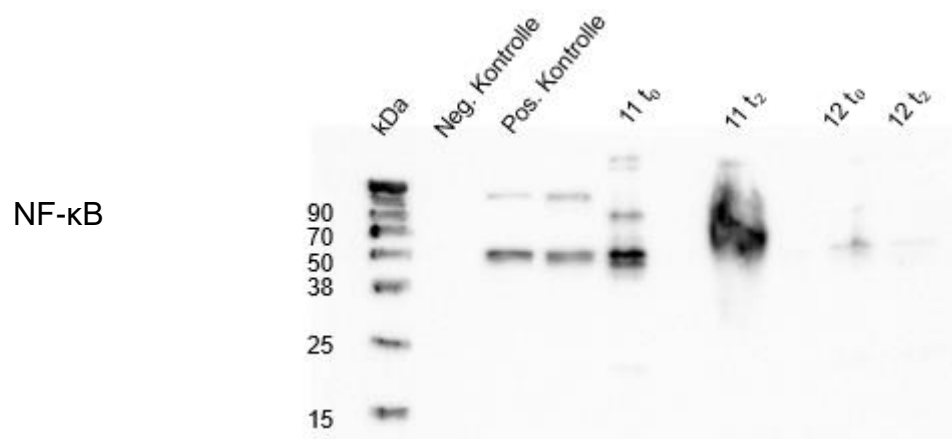
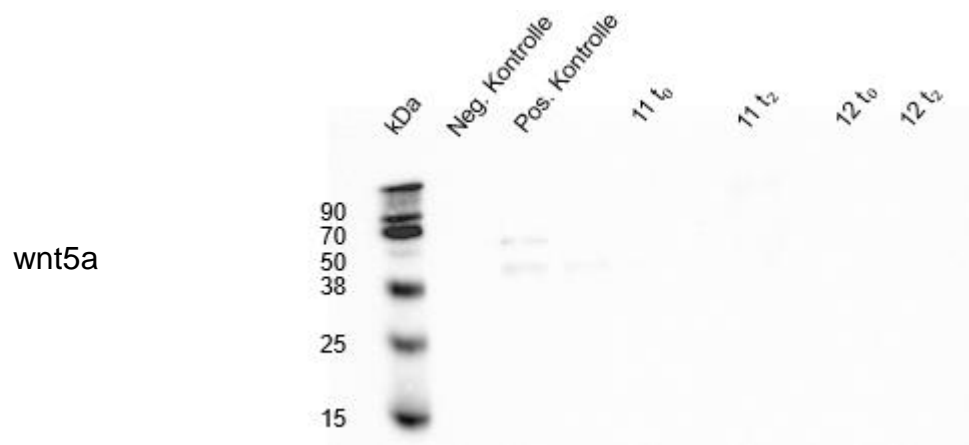
## 3. Western Blots der Probanden 3, 4 und 5:



## 4. Western Blots der Probanden 6, 7 und 8:

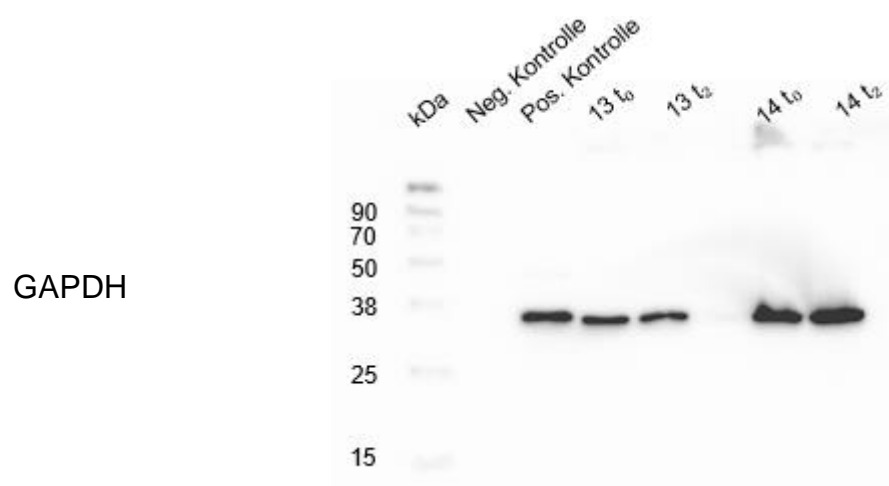
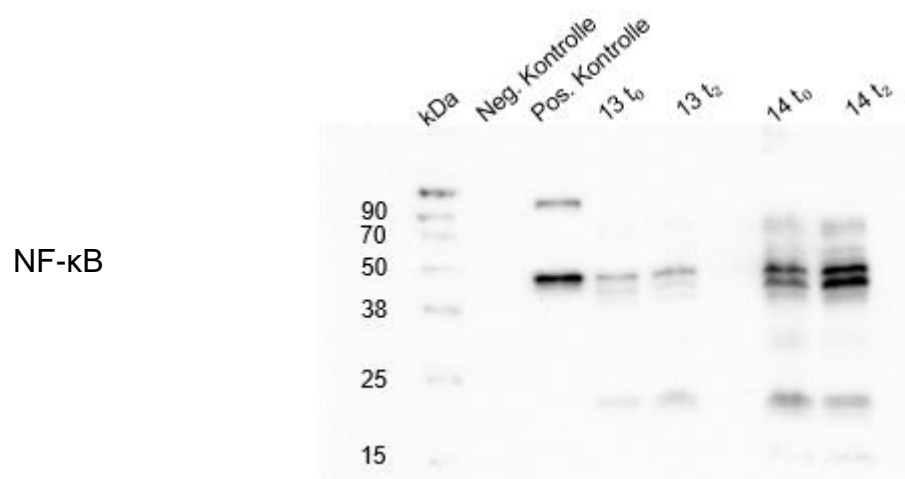
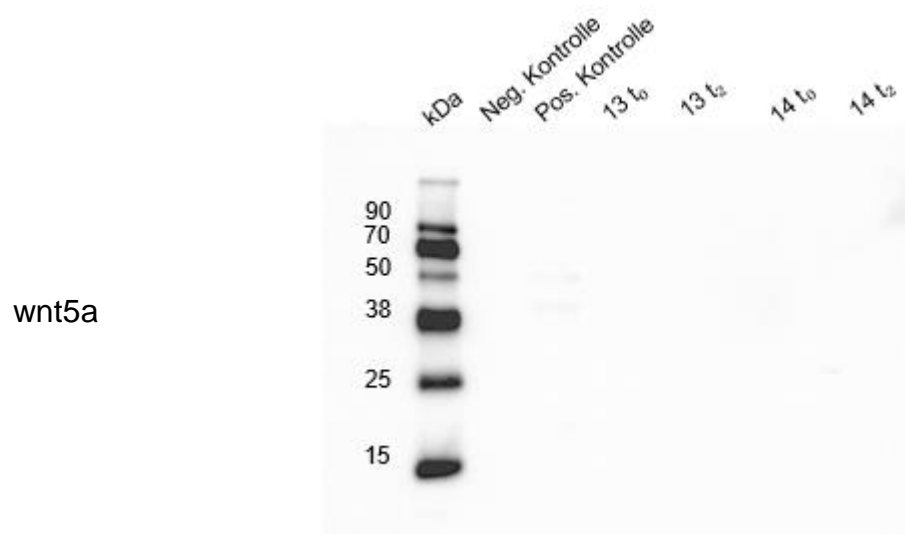


## 5. Western Blots der Probanden 11 und 12:

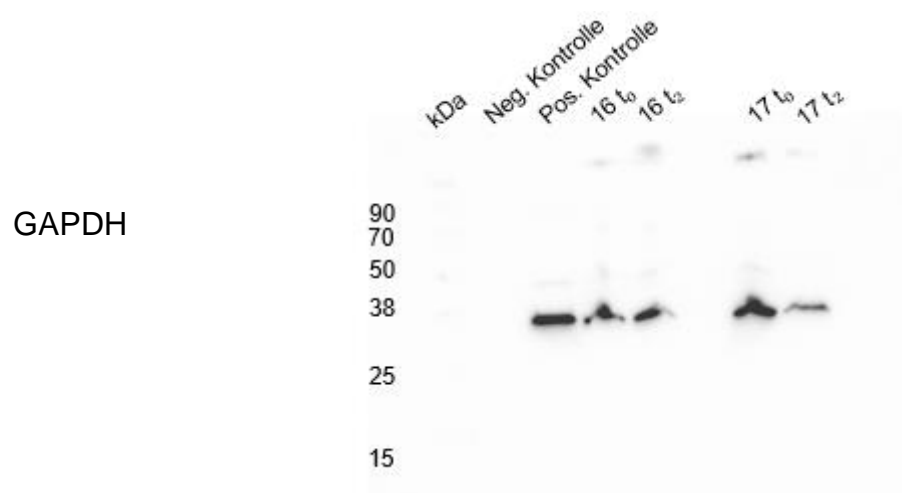
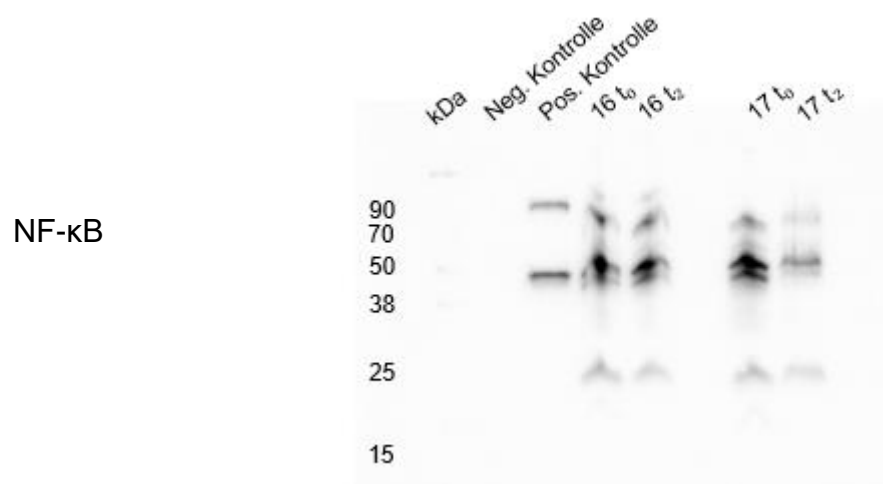
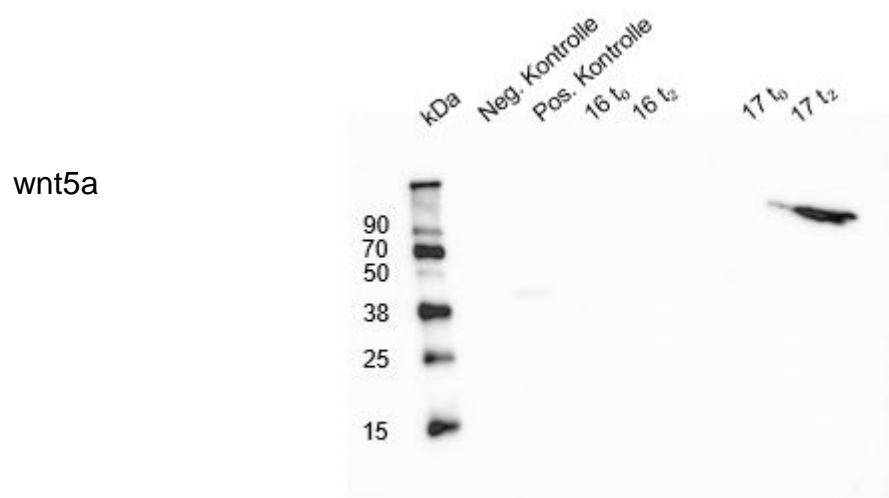




## 6. Western Blots der Probanden 13 und 14:

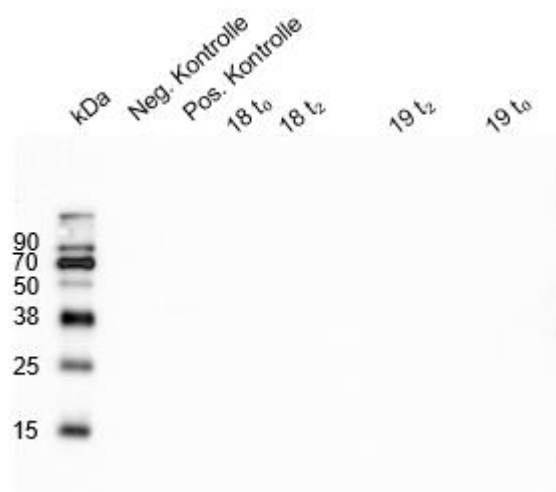
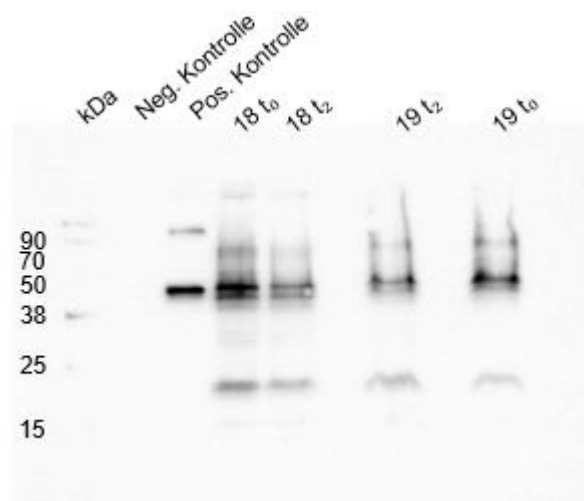


## 7. Western Blots der Probanden 16 und 17:



## 8. Western Blots der Probanden 18 und 19:

wnt5a

NF- $\kappa$ B

GAPDH

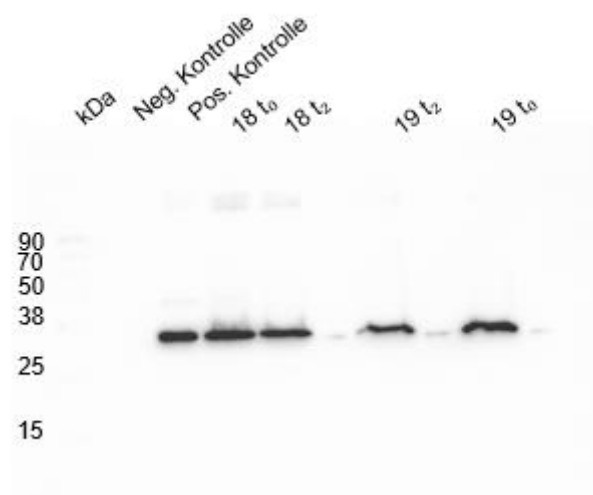


Tabelle: Daten der Western Blots mit dem primären Antikörper wnt5

Bezeichnung	Volumen (Intensität) wnt5a	Volumen (Intensität) GAPDH	wnt5a/GAPDH	Bandenstärke wnt5a in %
pos. Kontrolle	162180	38926168	0,004166349	100,00
2 t0	30899	40764367	0,00075799	18,19
2 t2	20988	32477181	0,000646238	15,51
9 t0	51516	37084842	0,001389139	33,34
9 t2	34344	37771722	0,000909252	21,82
10 t0	37524	42967683	0,000873308	20,96
10 t2	41128	52107268	0,000789295	18,94
pos. Kontrolle	309809	151245379	0,002048387	100,00
3 t0	58351	125596132	0,000464592	22,68
3 t2	40300	133901250	0,000300968	14,69
4 t0	30723	132484929	0,000231898	11,32
4 t2	29000	114357550	0,000253591	12,38
5 t0	34257	157205430	0,000217912	10,64
5 t2	42120	123866548	0,000340043	16,60
pos. Kontrolle	295634	150600295	0,001963037	100,00
6 t0	26688	128554704	0,0002076	10,58
6 t2	27555	177483900	0,000155254	7,91
7 t0	22184	108593970	0,000204284	10,41
7 t2	21492	169946478	0,000126463	6,44
8 t0	24892	167025957	0,000149031	7,59
8 t2	25728	152117040	0,000169133	8,62
pos. Kontrolle	1427085	131894895	0,010819865	100,00
11 t0	39735	124531875	0,000319075	2,95
11 t2	43700	80738400	0,000541254	5,00
12 t0	38171	102947089	0,000370783	3,43
12 t2	24327	80051997	0,00030389	2,81
pos. Kontrolle	828960	131289060	0,006314007	100,00
13 t0	50774	110794221	0,000458273	7,26
13 t2	50706	85910436	0,000590219	9,35
14 t0	160650	91234900	0,001760839	27,89
14 t2	41855	183513055	0,000228076	3,61
pos. Kontrolle	1026592	122465952	0,008382673	100,00
16 t0	29095	99693550	0,000291844	3,48
16 t2	37856	86642296	0,000436923	5,21
17 t0	34416	135917808	0,000253212	3,02
17 t2	51304	85381834	0,000600877	7,17
pos. Kontrolle	175858	97236042	0,001808568	100,00
18 t0	26460	165895860	0,000159498	8,82
18 t2	47967	140896425	0,000340442	18,82
19 t0	37932	114223924	0,000332085	18,36
19 t2	30784	142926272	0,000215384	11,91
pos. Kontrolle	0	178879740	0	0,00
1 t2	0	94873640	0	0,00

Tabelle: Daten der Western Blots mit dem primären Antikörper NF-κB.

Bezeichnung	Volumen (Intensität) NF-κB	Volumen (Intensität) GAPDH	NF-κB/GAPDH	Bandenstärke NF-κB in %
pos. Kontrolle	18193204	3104952	5,85941554	100,00
2 t0	17025720	3084335	5,520061861	94,21
2 t2	6845109	2224463	3,077196159	52,52
9 t0	7473636	2571454	2,906385259	49,60
9 t2	2650265	3333382	0,795067892	13,57
10 t0	2642633	3723091	0,709795436	12,11
10 t2	13709404	6022814	2,276245622	38,85
pos. Kontrolle	14620731	75869752	0,192708301	100,00
3 t0	30812278	115964795	0,265703725	137,88
3 t2	8100750	77352950	0,104724513	54,34
4 t0	9073887	91312575	0,099371713	51,57
4 t2	7359550	80254100	0,091703103	47,59
5 t0	7827867	93694491	0,083546716	43,35
5 t2	497328	57943964	0,008582913	4,45
pos. Kontrolle	10933211	64457699	0,169618388	100,00
6 t0	4581408	45975216	0,099649516	58,75
6 t2	25563010	88486035	0,288893157	170,32
7 t0	16115830	71844294	0,224316074	132,25
7 t2	8753562	93932136	0,093190279	54,94
8 t0	13525078	81490283	0,165971666	97,85
8 t2	7717248	64893216	0,118922261	70,11
pos. Kontrolle	4687375	65154100	0,071942902	100,00
11 t0	8460495	50300820	0,168197954	233,79
11 t2	8398250	44407450	0,189118042	262,87
12 t0	1425312	39598419	0,035994164	50,03
12 t2	226083	25585221	0,008836469	12,28
pos. Kontrolle	9194340	43098420	0,213333575	100,00
13 t0	1834860	33223474	0,055227819	25,89
13 t2	2048706	28112670	0,072874828	34,16
14 t0	8772900	54648250	0,16053396	75,25
14 t2	8362035	29610625	0,282399814	132,37
pos. Kontrolle	10199392	47762960	0,213541874	100,00
16 t0	19469175	31635285	0,61542594	288,20
16 t2	18793424	25513072	0,736619408	344,95
17 t0	24856752	48663408	0,51078938	239,20
17 t2	8289836	16449822	0,503946851	235,99
pos. Kontrolle	7792354	41870580	0,18610571	100,00
18 t0	11832420	59541780	0,19872466	106,78
18 t2	7547339	45859874	0,164573915	88,43
19 t0	6104906	34028716	0,179404536	96,40
19 t2	8696192	51329408	0,169419293	91,03
pos. Kontrolle	27539843	91382563	0,301368687	100,00
1 t2	10197264	115199968	0,088517941	29,37

## 9. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Die eingereichte schriftliche Fassung der Arbeit entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Arbeit noch nicht als Abschlussarbeit an anderer Stelle vorgelegt habe.

Ort, Datum

Unterschrift

## **10. Danksagung**

Einen ganz besonderen Dank möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Matthias Laudes für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen, aussprechen.

Für die hervorragende Unterstützung und Betreuung bedanke ich mich auch ganz herzlich bei Dr. Dominik Schulte.

Vielen Dank an die gesamte Arbeitsgruppe Laudes, besonders an meine Kolleginnen Kathrin Tuerk, Katharina Hartmann, Daniela Fangmann und Isabelle Relling für die gute Organisation, die Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre.

Für die Zusammenarbeit und die Unterstützung bei der Patientenrekrutierung danke ich den Kollegen der Viszeralchirurgie und der Urologie des UKSH Kiels. Der Dank gilt insbesondere den Klinikdirektoren Prof. Dr. Becker und Prof. Dr. Jünemann sowie Prof. Dr. Egberts, Dr. Alexander Hendricks und Robin Behrens.

Außerdem möchte ich dem Gesundheitskonzern Fresenius danken, der dieses Projekt möglich gemacht hat.

Ganz besonders danken möchte ich auch meinen Freunden und meiner Familie, die mich immer unterstützen, mich aufbauen und ermutigen.

Vielen Dank an meine beste Freundin Alina Hartmann, die mich das ganze Studium über begleitet hat und immer ein offenes Ohr für mich hat.

Meinen Eltern und Geschwistern möchte ich für ihre uneingeschränkte und vielseitige Unterstützung, für ihre ständige Hilfsbereitschaft und ihre lieben Worte danken.

Und auch bei meinen Großeltern bedanke ich mich ganz herzlich für ihr Interesse und ihre Unterstützung.

## **11. Veröffentlichung**

YARE (Young active research in endocrinology), Würzburg 2016, Vortrag: The effect of omega-3-fatty acids on the inflammatory potential of human lymphocytes in vivo.